

博士論文

論文題目 びまん型胃癌における *RHOA* 変異と  
転座に関する臨床病理学的解析

氏 名 田中 淳

## 目次

要旨	1
第1章 序文	2-4
第2章 びまん型胃癌における <i>RHOA</i> 変異の臨床病理学的解析	
第1節 背景と目的	5-8
第2節 材料と方法	
1. 材料：病理組織検体	9
2. 方法	
2-1. 病理組織学的評価	10
2-2. DNA 抽出	11
2-3. <i>RHOA</i> 変異解析	11-13
2-4. TA-cloning と colony PCR、 direct-sequencing	13
2-5. 腫瘍内均一性解析	14
2-6. 腫瘍切片における腫瘍細胞比率計算	14-15
2-7. Allelic imbalance 解析	15-16
2-8. <i>RHOA</i> に対する fluorescence <i>in situ</i> hybridization (FISH)	16-17
2-9. 統計解析	17
2-10. 倫理委員会の承認に関する事項	18

### 第3節 結果

1. Digital PCR による *RHOA* 変異検出力の確認 19-20
2. *RHOA* 変異胃癌の臨床病理学的特徴 21-29
3. *RHOA* 変異の腫瘍内分布 30-35
4. Allelic imbalance 解析、クラスター解析、*RHOA* FISH 解析 36-41

### 第4節 考察

1. *RHOA* 変異胃癌の臨床病理学的特徴について 42-46
2. *RHOA* 変異胃癌における腫瘍内不均一性について 46-47

## 第3章 びまん型胃癌における転座の臨床病理学的解析

### 第1節 背景と目的 48-50

### 第2節 材料と方法

1. 材料：病理組織検体と臨床経過 51
2. 方法
- 2-1. RNA 抽出 51
- 2-2. cDNA 合成 51
- 2-3. PCR 52-53
- 2-4. DNA シーケンシング 54
- 2-5. Fluorescence *in situ* hybridization 54

2-6. 統計解析	55
2-7. 倫理委員会の承認に関する事項	55
第3節 結果	
1. RT-PCR、ダイレクトシーケンス結果	56
2. <i>CLDN18</i> FISH 結果	56-58
3. 転座と各病理組織学的因子との関係について	58-63
4. 生存解析	64-65
第4節 考察	
1. <i>CLDN18-ARHGAPs</i> 転座の頻度、種類について	66-67
2. 転座と臨床病理学的因子との相関について	67-68
3. 転座蛋白質機能について	68-71
第4章 結語	72-73
謝辞	74-75
参考文献	76-89

## 要旨

びまん型胃癌における *RHOA* 変異、*CLDN18-ARHGAP* 転座の臨床病理学的な意義について研究した。びまん型胃癌の *RHOA* 変異(Y42C、R5Q/W)を digital PCR で検索し先行研究と合わせ 20 変異例を解析した。Y42C 例は R5W 例と比較し進行癌に多く、個細胞性浸潤傾向を示した。表層、深部、リンパ節転移巣すべてに同一の変異がみられた。転座例はびまん型胃癌の 15%にみられ、予後不良な一群であったが、*RHOA* 変異と転座例は相互排他的であった。本研究により、*RHOA* シグナル異常に関連した遺伝子異常が、びまん型胃癌の発癌、浸潤・進展を促進している可能性があることを明らかにした。

## 第1章 序文

胃癌は近年減少傾向であるものの肺癌、肝癌に次いで世界の癌の死因第3位である(1)。世界全体でみると胃癌は東南アジアに多い傾向を示し(1)、日本では肺癌に次いで死因第2位である(2)。

胃癌の組織分類として世界的に使用されているものの一つに Lauren 分類があり、基本的に胃癌を腸型胃癌とびまん型胃癌に大別している(3)。腸型胃癌は胃癌全体の 50-70%程度(4-6)を占め、病理組織学的には腫瘍細胞が明瞭な腺腔構造を形成し高分化型腺癌が主として増殖するものを指す。一方、びまん型は胃癌の 40%程度を占め、腫瘍細胞が豊富な線維性間質を背景として個細胞性、小胞巣状に細かく浸潤する組織学的特徴を有しており、肉眼的に胃壁のびまん性肥厚をともなった症例は特にスキルス胃癌と称される。びまん型胃癌は進行が早く、5年生存率は 20%弱と腸型胃癌より予後不良である(7)。治療法としては基本的に外科的切除と化学療法が一般に行われている。肺癌や大腸癌、乳癌と同様に最近胃癌にも分子標的薬である抗 HER2 抗体が使用されるようになったが、腸型胃癌の 20-30%程度に HER2 増幅がみられるのに対し、びまん型胃癌では 10%程度で、分子標的薬の恩恵を受けられる患者は少数である(8、9)。それゆえ、分子標的薬を含む新たな治療戦略がびまん型胃癌では特に必要とされている。

近年、次世代型シーケンサーが開発され比較的容易にかつ安価に全ゲノムシーケンス(WGS)、全エクソンシーケンス(WES)、全トランスクリプトーム解析が可能になったことにより、さまざまな疾患の包括的なゲノム情報、発現情報が報告されるようになってきた。胃癌もその例外ではなく、包括的なゲノム解析の報告は2011年のWangらの報告を皮切りに見られはじめ、徐々に胃癌の分子プロファイルが明らかにされつつある(10-14)。多数例のびまん型胃癌に関するWGS・WES解析結果はKakiuchiら(11)とWangら(10)によって報告され、びまん型胃癌に*RHOA*変異が特異的にみられることが初めて明らかになった。また家族性びまん型胃癌の原因遺伝子である*CDHI*の変異が孤発性びまん型胃癌にも高頻度に認められた。その後、The cancer genome atlas(TCGA)からも胃癌の包括的ゲノム解析結果が発表された(12)。その報告によれば、胃癌は分子生物学的に4型に分類される。即ち、EBV関連胃癌(EB胃癌)、マイクロサテライト不安定型胃癌(MSI胃癌)、ゲノム安定型胃癌(GS胃癌)、染色体不安定型胃癌(CIN胃癌)である。特にGS胃癌では*RHOA*変異、*CDHI*変異が集積し高頻度にみられることに加え、新規転座*CLDN18-ARHGAP*が高頻度にGS胃癌にみられることが明らかになった。

以上のようにびまん型胃癌の分子プロファイルが徐々に明らかになってきたが、*RHOA*変異や新規転座*CLDN18-ARHGAP*を有する胃癌の詳細な病理組織学

的な特徴を明らかにした報告はいまだ少ない(15)。そこで今回、私は先行研究(11)とは別個に東京大学医学部附属病院で手術された胃癌検体 205 例を対象として、*RHOA* 変異を同定した。これらの新規変異症例と先行研究例と合わせて、変異症例の臨床病理学的解析を行った(第 2 章)。さらに digital PCR 法と、FISH 法を用いて腫瘍内不均一性について詳細に検討した(第 2 章)。次に新規転座 *CLDN18-ARHGAP* についても同じ症例を対象に検索し、転座陽性症例の臨床病理学的特徴を検討した(第 3 章)。



## 第2章 びまん型胃癌における *RHOA* 変異の臨床病理学的解析

### 第1節 背景と目的

次世代型シーケンサーを使用した最近の WGS と WES 研究で、*RHOA* 変異がびまん型胃癌に 14-25%程度の頻度で見られ、腸型胃癌にはみられないか、あってもごく少数であることが判明した(10-12)。*RHOA* は small GTPase 系の Rho family の一つで、GTP 結合型の活性化型と GDP 結合型の不活性化型との間をサイクルすることによって細胞内分子スイッチとしてさまざまな細胞機能を制御している(図 1)。具体的にはアクチン骨格構成、細胞遊走、細胞質分裂と細胞周期等に関与している(16-18)。

以前の我々の報告では *RHOA* 変異はコドン 5(R5W、R5Q)と 42(Y42C)にホットスポットを形成し、*RHOA* 変異全体(22 例)の半数(Y42C:6 例、R5 変異:6 例)が同ホットスポットに分布していた(11)(図 2a)。他の報告(合計 41 変異例)と比較すると Y42C/S 変異ホットスポット(13 例)は共通であったが、R5W 変異(3 例)、R5Q 変異(0 例)は少数であり、全変異例に対する頻度も我々の報告と比較すると低かった(10-12) (図 2b)。この相違の原因としては研究対象群の年齢構成や人種差、悪性腫瘍の進行度分類である各 TNM ステージの占める割合の違いなどが考えられた。R5 部の変異に関しては、小児バーキットリンパ腫の一部で *RHOA* R5Q 変異がみられることが報告されており(19)、*RHOA* R5 部にはいまだ

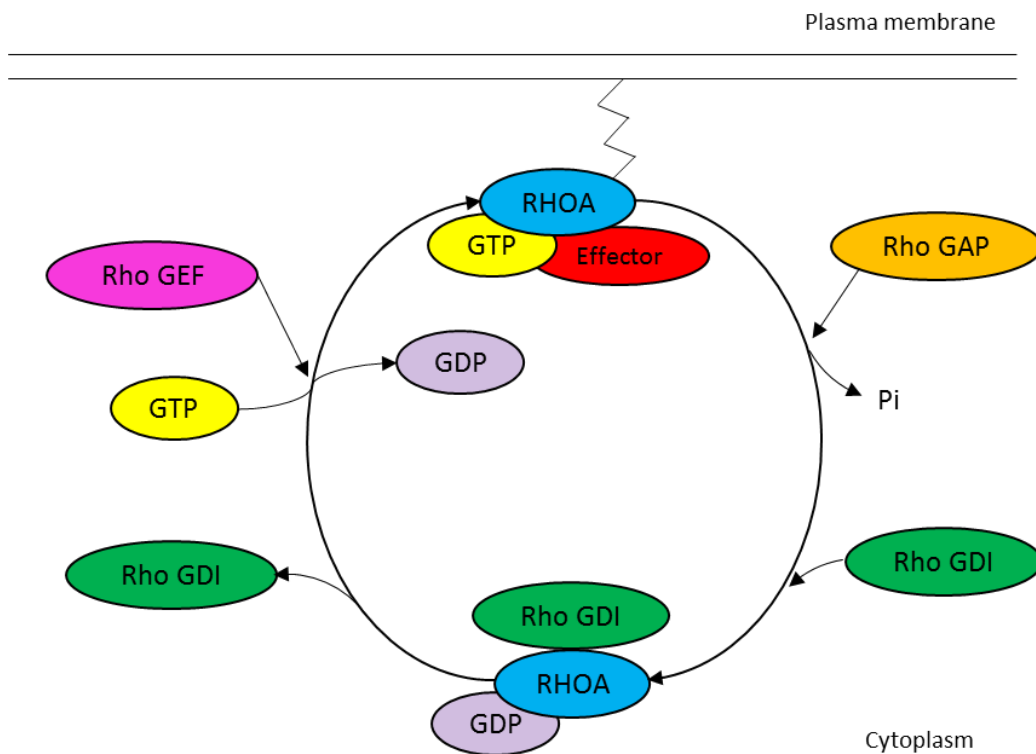


図1 RHOA の制御機構

RHOA は GTP 結合型と GDP 結合型をサイクルすることによって制御されており、GTP 結合型のみ下流の effector 分子と結合できシグナルを伝えることができる。活性化には RhoGEF が、不活化促進には RhoGAP が必要である。不活化 RHOA 安定化には RhoGDI が関係している。

機能的モチーフ、ドメインが報告されていないが、変異が入ることによって何等かの影響を RHOA 機能に及ぼしていると推測される。また一部の T 細胞リンパ腫に *RHOA* G17E 変異が高頻度にみられることが報告されているが、びまん型胃癌では少数であった(20-22)。In-silico (Polyphen-2)での機能予測では Y42C、R5 変異体は機能障害少なく、G17E 変異体は高度に障害されるとの結果であった(23)。しかし Y42C 変異体については以下に述べるように GDP 結合型の不活性型が増加すると報告があることや R5 部にホットスポットがあったことから

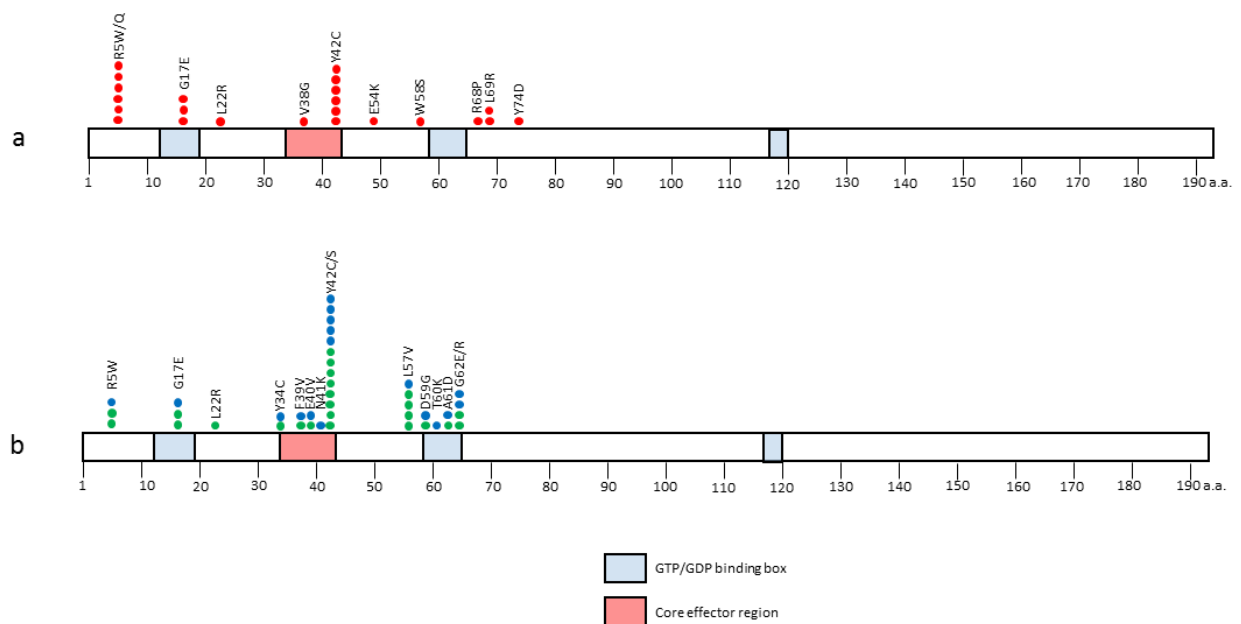


図2 *RHOA* 変異分布

我々の先行研究(13)で明らかにしたびまん型胃癌の *RHOA* 変異の分布(a)と他の研究報告(12; 青丸、14; 緑丸)で明らかにされた *RHOA* 変異の分布(b)を示した。(a)では Y42 と R5 の hotspot がみられるが、(b)では Y42C が大部分で、R5 変異は主要な hotspot を形成していない。

やはり何らかの機能変化が同変異部にあると考えられた。*RHOA* Y42C 変異は下流のシグナル蛋白質と結合する core effector domain に位置しており、*RHOA* 機能に影響を与えると予測されていた(24、25)。実際細胞株を使用した実験系で Y42C 変異型 *RHOA* 蛋白質は GDP 結合型の不活性化型が野生型と比較し多かったが、この変異型 *RHOA* を細胞株に導入すると癌形質を獲得することが示されており、この点において *RHOA* は oncogene と考えられた(10、11)。

*RHOA* は GTP ポケット、複数のエフェクタードメイン、Rho-GAP、RhoGEF 等多数の標的候補ドメインを有しており、びまん型胃癌における新規の druggable 分子として期待されている。このような状況下で *RHOA* 変異を有する

胃癌の病理組織学的特徴は、症例の蓄積が少ないことからいまだ完全には理解されていない。特に既存の報告ではより大きく、進行期のものを多く扱っていたために、早期癌の段階での特徴は明らかでない(10、12)。以上のようにびまん型胃癌における *RHOA* 変異の意義、R5Q、R5W、Y42C 変異それぞれの臨床病理学的違い、早期癌における意義に関して不明な点が多い。また *RHOA* 変異の胃癌発生における意義についても不明である。

これらの疑問を解決するために、我々は digital PCR 法を用い、胃癌 205 例の *RHOA* 変異(R5Q、R5W、Y42C)を調べ、その結果得られた *RHOA* 変異症例と先行研究で判明している *RHOA* 変異症例を合わせて、病理組織学的特徴について検討した。特に浸潤形式については変異タイプごとにスコアリングし詳細に比較した。さらに *RHOA* 変異の胃癌発生における意義を明らかにするために *RHOA* 変異アレル頻度の分布、allelic imbalance に着目して、腫瘍内均一性について調べた。

## 第2節 材料と方法

### 1. 材料：病理組織検体

東京大学医学部附属病院で 2000 年から 2013 年までに手術された早期胃癌症例 590 例と進行胃癌症例 407 例を review し、DNA 抽出に十分な腫瘍量を有する症例で、びまん型胃癌を呈するものを 123 例選択(早期癌 75 例、進行癌 48 例)した。対照群として腸型胃癌を 82 例選択(早期癌 15 例、進行癌 67 例)した (すべての症例に T 番号を振った)。ただし、先行研究使用症例は除外した(11)。該当する症例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロック (FFPE ブロック)を後述する DNA 抽出に供した。

さらに本研究で新たに *RHOA* 変異(R5Q、R5W、Y42C)陽性と判明した症例と先行研究症例(GC 番号が付与されている)で同変異陽性と判明している症例、計 20 例から次の 3 点を重視して腫瘍内不均一性を検討する 8 例を選択した。1.粘膜内成分が残存すること(粘膜内成分は腫瘍発生の比較的早期から存在する病変であると考えられるため)。2.高分化から低分化な腺癌まで多彩な組織型が少ないながらも認められること。3.それぞれの腫瘍成分量が変異スクリーニングに十分な量であること。

## 2. 方法

### 2-1. 病理組織学的評価

二人の病理医(田中淳、牛久哲男)によって、上記で選択した胃癌症例の腫瘍の大きさ、深達度、Lauren 分類、リンパ管侵襲、静脈侵襲、リンパ節転移を評価した。なお病理組織学的診断は日本胃癌学会から提唱されている胃癌取扱い規約(第 14 版)に従って行った(26)。

R5Q、R5W、Y42C 変異症例間の浸潤パターンの比較には二つの因子（アメーバ様浸潤、網状浸潤）をスコアリングして評価した。アメーバ様浸潤は間質の破壊を伴わずに個細胞性に癌細胞が浸潤していくパターンで、低分化腺癌であるびまん型胃癌では腫瘍内のさまざまな部位にみられる所見である(27-29)。しかし固有筋層筋束内にまで腫瘍細胞浸潤がみられることは少なく、通常は筋束間に線維化を伴って浸潤することが多い。そこで本研究ではより腫瘍の浸潤能を詳細に評価するため、固有筋層の筋束内に癌細胞が浸潤する場所が腫瘍中心部の 1 切片中に何か所みられるかでスコアリングした(score 0; 0-1 か所、score 1+; 2-3 か所、score 2+; 4-10 か所、score 3+; 11 か所以上)。網状浸潤も腫瘍中心部 1 切片で評価した。固有筋層において粗大線維化を伴わずに浸潤する腫瘍面積の固有筋層浸潤部全面積に対する割合と定義し、スコアリングした(score 0; 0%、score 1+; 10%以下、score 2+; 10-50%、score 3+; 50%以上)。

## 2-2. DNA 抽出

FFPE ブロックから 10 $\mu$ m 厚で未染色標本を 10 枚作成した。対応する HE スライドと照らし合わせできるだけ背景組織が混入しないように、腫瘍をメスで手動的に剥離させ、1.5ml エッペンドルフチューブに回収した。引き続いて DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen、Tokyo、Japan)を用い、メーカープロトコルに従い DNA 抽出した。次に吸光度計 NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific、MA、USA)で濃度を計測、-20 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。

## 2-3. *RHOA* 変異解析

本研究では *RHOA* 変異のホットスポットを形成しているコドン 5(R5W、R5Q)、コドン 42(Y42C)を digital PCR (BioMark nanofluidics system、Fluidigm、South San Francisco、CA)を用いて検出した(30)。使用したプライマー、標識プローブは表 1 に示した。Digital PCR (dPCR)は TaqMan gene expression master mix(ABI、Foster City、CA、USA)を用いて行った。1 反応に対し、1 $\times$  TaqMan gene expression master mix、*RHOA* wild type (wt)-FAM TaqMan assay probe (250nM)、*RHOA* mutant (mut)-VIC TaqMan assay probe (250nM)、forward primer (900nM)、reverse primer (900nM)、1 $\times$  sample loading reagent (Fluidigm)、約 50 ng DNA となるように調整した。作成した反応液を専用プレートのウェルに注入す

ると、そのプレート内で各サンプルがそれぞれ 770 の微細分画に分配される。

表1 プライマーとプローブ配列

プライマー	配列
RHOA Y42 Fw	5'-GAGGTGTATGTGCCACAGTGT-3'
RHOA Y42 Rv	5'-TGCTTTCCATCCACCTCGAT-3'
RHOA R5 Fw	5'-TCTGTGTTTTGTGTTTCAGCAATG-3'
RHOA R5 Rv	5'-GGCTCCATCACCAACAATCAC-3'
プローブ	
Y42Y	5'-FAM-TGCCACATAGTTCT-MGB-3'
Y42C	5'-VIC-CTGCCACACAGTTC-MGB-3'
R5R	5'-FAM-TTTCTTCCGGATGGC-MGB-3'
R5Q	5'-VIC-TTTCTTCTGGATGGC-MGB-3'
R5W	5'-VIC-TTTCTTCCAGATGGC-MGB-3'

その後、これら微細分画の中でそれぞれ PCR 反応が行われ、各サイクルごとに FAM シグナル(野生型)と VIC シグナル(変異型)が測定される。PCR 終了後、最終的なシグナル陽性微細分画数をカウントし、サンプル内の変異アレル/野生アレル比をポアソン分布補正を用いて計算した(31)。この値を使用し、検体の変異アレル頻度(mutant allele frequency; MAF)を  $\text{VIC counts} / (\text{FAM} + \text{VIC counts})$  比として計算した。Digital PCR による *RHOA* 変異検索の感度については、以前の報告で *RHOA* 変異陽性と判明している症例の凍結検体由来 DNA を使用し確認した(11)。この検討の結果、*RHOA* 変異陽性例の MAF の最低値が 0.009 であったので、本研究では *RHOA* 変異スクリーニングにおいて MAF が 0.009 以上の検体を dPCR 陽性とし、以下の TA-cloning を行った。なお、MAF が 0.009 未満の症例については digital PCR 法や次世代型シーケンサー以外の方法での低頻



度アレルの再確認が困難であるため、陰性として扱った。

#### 2-4. TA-cloning と colony PCR、direct-sequencing

Digital PCR で陽性と判定した症例に関しては、同一の DNA サンプル、*RHOA* 用プライマーセットを用いて TA-cloning、ダイレクトシーケンスにより変異を確認した。具体的には AmpliTaq-GOLD (Applied Biosystems、Foster City、CA、USA)を用いて PCR を行い、PCR 産物を MinElute PCR purification kit (Qiagen、Hilden、Germany)を用いて精製した。次に TOPO TA cloning kit (Invitrogen、Tokyo、Japan)、ECOS competent *E.coli* DH5 $\alpha$  (NIPPON GENE CO.、Tokyo、Japan)で TA クローニング、形質転換を行い、LB 寒天培地(アンピシリン、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド、イソプロピル- $\beta$ -チオガラクトピラノシド含有)プレートに播いた。翌日、blue-white selection で白色コロニーを 100 個以上ピックアップし、これらをそれぞれ PCR テンプレートとし、同一の *RHOA* プライマーセットを用いてコロニーPCR を行った。その後ダイレクトシーケンスで各コロニーに導入された *RHOA* 遺伝子断片が野生型 *RHOA* アレルか、変異型アレルかを決定し、変異アレルが存在することを確認した。また変異型アレルの全体に占める比率を求めた。

## 2-5. 腫瘍内均一性解析

材料の項目で記載した条件で選択した *RHOA* 変異症例 8 例について、粘膜内病変、深部浸潤部、高分化腺癌成分、粘液癌成分等を別々にレーザーマイクロダイセクション(CTR6000、Leica Microsystems、Wetzlar、Germany)で採取し、DNA を抽出した。その後、digital PCR 解析を行い変異の有無を確認した。さらに mutant allele index (MAI)(MAF を各症例における MAF 平均値と腫瘍比率で除いたものと定義)を計算した。MAI は腫瘍組織における変異アレル頻度分布の偏りを表している。

## 2-6. 腫瘍切片における腫瘍細胞比率計算

びまん型胃癌は背景に広範な線維化を伴って浸潤増殖する癌で、腫瘍部をレーザーマイクロダイセクションで採取しても必ず正常組織由来の DNA が混入し、正確な腫瘍内変異アレル頻度を評価することが難しい。そこで、検索領域における腫瘍比率を正確に求めるために、腫瘍切片を上皮系マーカーである抗 AE1/AE3 抗体(NCL-L-AE1/AE3、1 : 100、Leica Biosystems、Tokyo、Japan)による免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色は自動染色装置 Benchmark XT(Ventana Medical Systems Inc.、Tucson、AZ、USA)を用い、標準プロトコルに従って行った。染色スライドはデジタルスライド化(NanoZoomer 2.0-HT Digital

slide scanner、Hamamatsu Photonics、Hamamatsu、Japan)を行った後、画像解析ソフト(Tissue Studio、Definiens AG、Munich、Germany)を用いて抗 AE1/AE3 抗体陽性細胞数の全細胞数(核数でカウント)に対する比率を求めた(32-34)。

## 2-7. Allelic imbalance 解析

*RHOA* 遺伝子が存在する三番染色体の allelic imbalance を調べるために、droplet digital PCR(QX200、Bio-Rad、Hercules、CA、USA)を使用して、検索対象例でヘテロ接合体となっている二つの SNPs [rs743659 located in 3:46447474(SNP1 とする)、 rs2236944 located in 3:50254711(SNP2 とする)] のアレル比(Allelic imbalance value; AIV)を求めた(35、36)(図 3)。AIV はメジャーアレル数をマイナーアレル数で除した値と定義した。計測には二種類のアレルを FAM 標識と VIC 標識プローブで認識するライフテクノロジー社の TaqMan SNP Genotyping Assay (Assay code: C2610650-1 for SNP1、C1194143-1 for SNP2)を使用した。解析手順は、1 反応液 20 $\mu$ l を 1x ddPCR Supermix for Probe (Bio-Rad、Hercules、CA、USA)、1x TaqMan SNP Genotyping Assay mix となるように作成し、専用ウェルに注入し、Droplet generator (Bio-rad)でウェル内に微小油性滴(以下ドロプレットと呼ぶ、内容量約 1nL)を約 20000 個作成した。次に作成したドロプレットを PCR プレートに移し、各ドロプレット内で PCR を実施した。反

応終了後、droplet leader (Bio-rad)によって、各ドロプレットの FAM、VIC シグナルを測定し、QuantaSoft software (Bio-rad)で解析した。

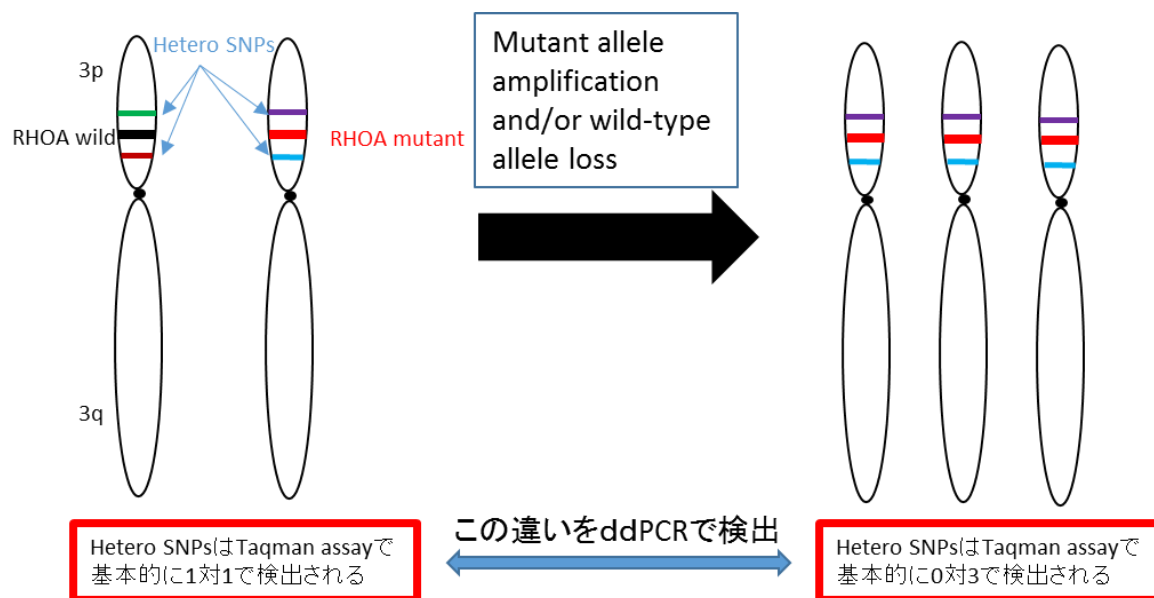


図3 SNPs を利用した allelic imbalance 解析

*RHOA* 変異癌の背景正常粘膜において、ヘテロである SNPs を PCR であらかじめ調べておき、ヘテロであった SNPs を認識する taqman probe を使用し、アレル比を求める。正常部では基本的に 1 : 1 で検出されるが、腫瘍部では一方のアレルの増加あるいは欠失があれば、比が 1 からずれることを利用し、腫瘍組織における allelic imbalance を調べた。

## 2-8. *RHOA* に対する fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

腫瘍細胞における *RHOA* コピー数を評価するため、腫瘍組織標本を用いて FISH を行った。*RHOA* 特異的プローブと 3 番染色体セントロメア特異的プローブ (Empire genomics、New York、USA)を用いて、以下の染色工程を行った。4  $\mu\text{m}$  薄切切片を Pretreatment solution (GSP Laboratory、Kawasaki、Japan)で 95°C、30 分前処理した。その後、0.8% pepsin/0.01M HCL で 37°C、5-10 分処理し、エ

タノールで脱水後、FISHプローブを添加し、37°C、48-72時間湿潤箱でインキュベートした。その後、2xSSCで洗浄、エタノールで脱水、DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole)で対比染色を施し、蛍光褪色防止剤を含む封入剤で封入した。評価は蛍光顕微鏡 LM6000B imaging system (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)を用いて行った。1個の *RHOA* シグナル (Texas-Red)と2個の *CEP3* シグナル(FITC)を有する腫瘍核数が10%以上ある場合を Loss of heterozygosity (LOH)と判定した。また3個以上の *CEP3* シグナルまたは *RHOA* シグナルを有する腫瘍核数が10%以上みられる場合に三番染色体の異数性ありと判定した。閾値10%の決定には軟部組織腫瘍のさまざまな遺伝子異常をFISHで評価した際に10%程度の細胞に欠失等がみられることを参考にした(37)。また評価にあたりいずれの部位でも少なくとも50個以上の細胞について検討した。

## 2-9. 統計解析

すべての統計解析はJMP Pro 11(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いて行った。P値は0.05未満を有意とした。検定はFisher's exact test、Mann-Whitney U test、Kruskal-Wallis testで行った。

## 2-10. 倫理委員会の承認に関する事項

単一の変異や免疫組織学的解析等を目的とする東京大学医学部附属病院の病理組織検体の使用に関しては、東京大学大学院医学系研究科・医学部研究倫理委員会に申請し、承認を受けた(審査番号 G3521)。

### 第3節 結果

#### 1. Digital PCR による *RHOA* 変異検出力の確認

Digital PCR (dPCR)を用いた変異解析の例を図 4a に示した。上段のパネルは *RHOA* 変異陽性例の結果で、770well のうち 143well に FAM シグナル(野生型)、23well に VIC シグナル(変異型)が認められた。ポアソン分布で補正し、変異アレル頻度は 0.14 と計算された。下段のパネルは *RHOA* 変異陰性例の結果で、FAM シグナルのみ検出され、VIC シグナルはまったく検出されていない。次に Digital PCR を用いた *RHOA* 変異アレル頻度の結果と次世代型シーケンサーの結果を図 4b に示した。Digital PCR と次世代型シーケンサーの *RHOA* 変異アレル頻度はよく相関することが確かめられた( $R^2=0.8767$ )。次世代型シーケンサーでの解析でもっとも変異アレル頻度が低かった症例(GC15、MAF0.01)の dPCR 解析結果は MAF0.009 であったので、以降の *RHOA* 変異例スクリーニングにおいては MAF0.009 以上の検体を dPCR 陽性例とした。

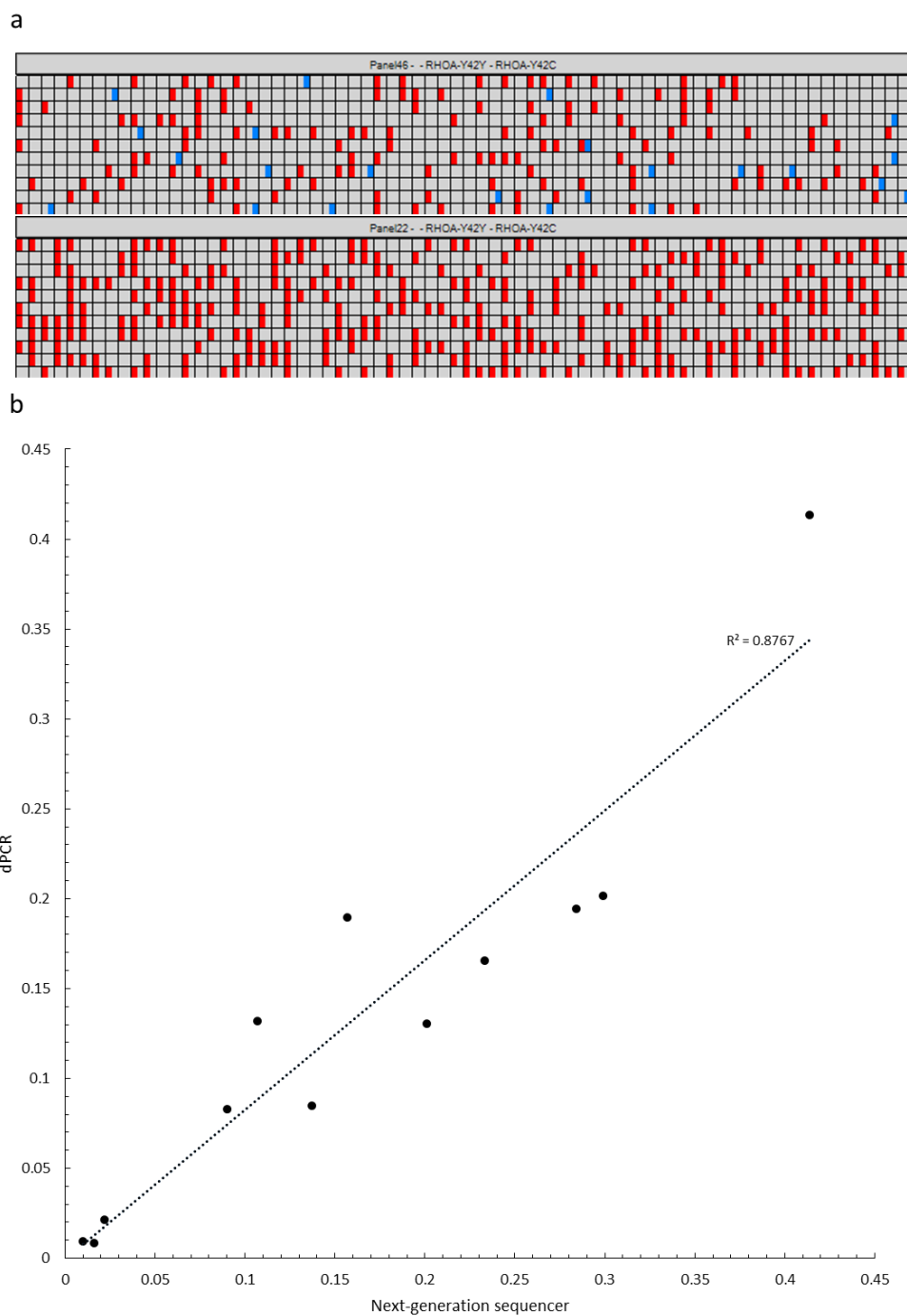


図4 Digital PCR 結果と正確性の確認

Digital PCR 結果の陽性例と陰性例を(a)に、次世代型シーケンサー(NGS)による変異アレル頻度と digital PCR によるその相関を(b)に示した。(a)の上段に *RHOA* 変異陽性例で VIC シグナル(青)が複数確認できるが、下段の陰性例では VIC シグナル(青)は 1 個も確認できない。(b)では NGS と dPCR による変異アレル頻度の結果が幅広いレンジで一致していることがわかる。



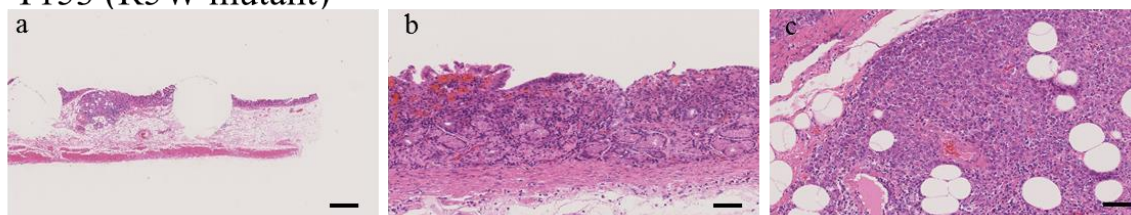
## 2. *RHOA* 変異胃癌の臨床病理学的特徴

Digital PCR で *RHOA* 変異を検索した結果、びまん型胃癌 123 例中 7 例(5.7%) に変異がみられた(*Y42C*、3 例; *R5Q*、2 例; *R5W*、2 例)(図 5、6)。腸型胃癌 83 例には 1 例も認められなかった。*RHOA* 変異のあった 7 例は TA-cloning と コロニー-PCR を併用した方法でも検索し、すべての例について *RHOA* 変異を再確認した(図 7)。先行研究のびまん型胃癌 87 例と本研究の 123 例を合わせ、*RHOA* 野生型と *RHOA* *Y42C*、*R5Q*、*R5W* 変異型の 2 群に分け臨床病理学的因子について検討したところ、*RHOA* 変異群(*Y42C*、*R5Q*、*R5W*)で有意に早期の癌、静脈侵襲陰性の症例が多かった(それぞれ  $P=0.019$ 、 $0.015$ )(表 2)。

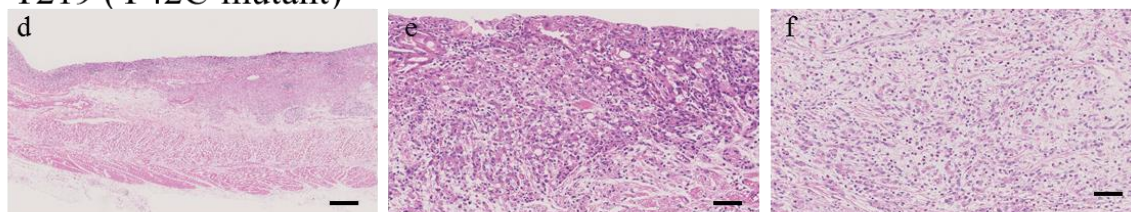
次に、先行研究と本研究で *RHOA* 変異(*Y42C*、*R5W/Q*)を有すると判明した 20 例に関しては変異種類ごとの臨床病理学的因子、浸潤パターン(アメーバ様、網状)の違いを検討した(*Y42C*; 9 例、*R5Q*; 4 例、*R5W*; 7 例)(表 3、4)。まず、*R5W* 変異例は 7 例のうち 3 例(43%)が粘膜内癌という特徴があった。変異間の違いに関して *Y42C* 変異例は *R5W* 変異例と比較すると、深く浸潤する傾向にあり( $pT1a$  vs  $pT1b-4$ 、 $P=0.063$ )、リンパ管侵襲が多い傾向が認められた( $P=0.060$ )。遠隔転移については *Y42C* 変異例 2 例に認められたが、*R5* 変異例において転移はみられなかった。またアメーバ様浸潤と網状浸潤(図 8、9)に関しては、変異種類間でいずれも有意差は認められなかったものの、*Y42C* 変異例

は R5 変異例と比較し、ほとんど線維化を伴わずに個細胞性に筋束内に浸潤するパターンが多く認められた(P=0.143)。しかしながら、固有筋層内でこのような浸潤パターンを示す Y42C 例でも粘膜下層では豊富な線維化を伴っていた。一方、ほとんどの R5 変異例は固有筋層内では筋束間にさまざまな程度に線維化を伴って浸潤しており、R5W 例においては 1 例も筋束内浸潤を示す例は認められなかった。また R5Q 例は R5W 例と比較し、線維化の程度が強い傾向があった。

**T153 (R5W-mutant)**



**T219 (Y42C-mutant)**



**T232 (Y42C-mutant)**

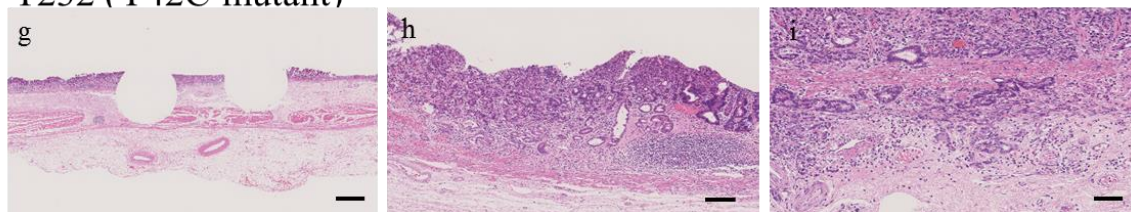
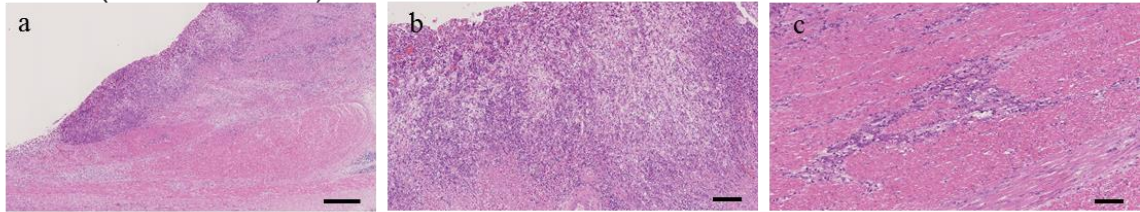


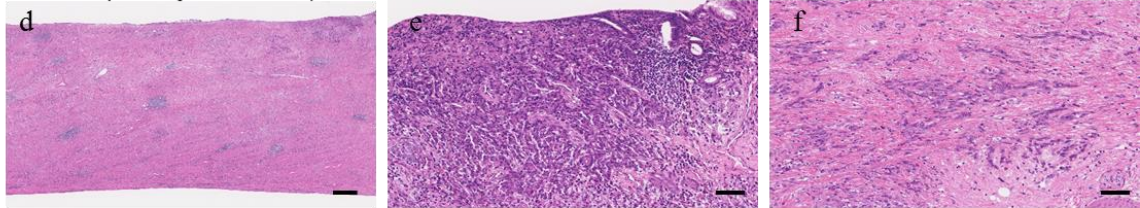
図 5 RHOA 変異早期癌例

それぞれの症例のルーペ像、中拡大、強拡大が示されている。各写真右下黒色バーの長さはそれぞれ次の長さを表す。(a, d, g)1mm、(b, c, e, f, i)50 $\mu$ m、(h)100 $\mu$ m

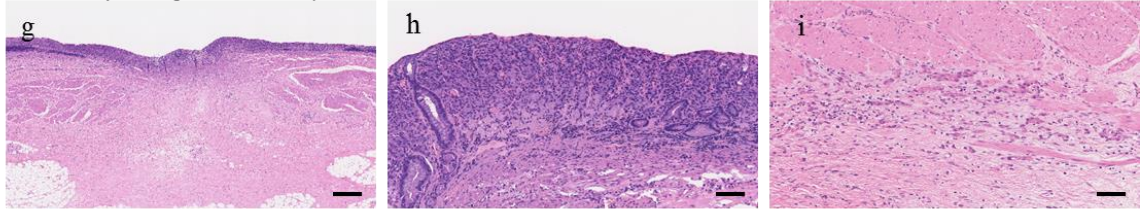
T118 (R5W-mutant)



T124 (R5Q-mutant)



T174 (R5Q-mutant)



T191 (Y42C-mutant)

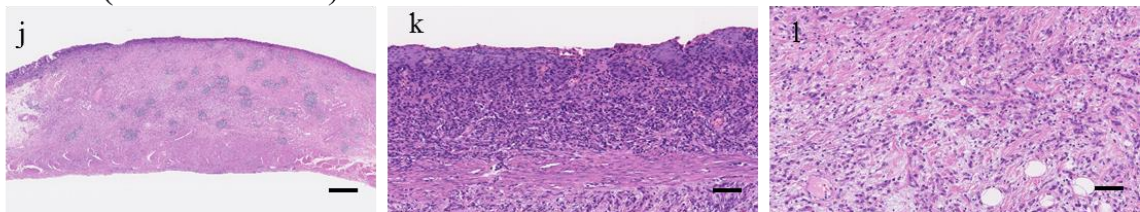


図6 RHOA 変異進行癌

それぞれの症例のルーペ像、中拡大、強拡大が示されている。各写真右下黒色バーの長さはそれぞれ次の長さを表す。(a、g)500 $\mu$ m、(b)100 $\mu$ m、(c、e、f、h、i、k、l)50 $\mu$ m、(d、j)1mm

## Digital PCRとTA-cloningによる変異アレル頻度結果

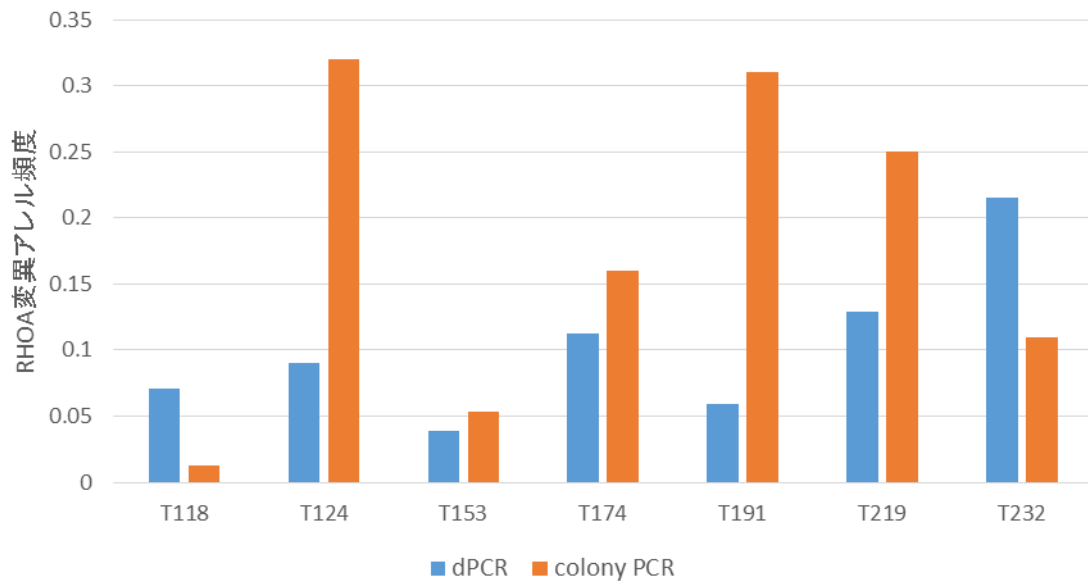


図7 RHOA 変異例の dPCR と TA-cloning による変異アレル頻度解析結果

Digital PCR 法で変異が検出された症例は TA-cloning とコロニーPCR 法を併用した方法によっても変異が確認された。変異アレル頻度の違いは digital PCR では溶液中に存在する野生型アレルと変異型アレルをそれぞれ特異的に認識するプローブを使用し直接認識するのに対し、後者では PCR 後のクローニングステップやコロニーピックアップし再度 PCR し、それからダイレクトシーケンスと実験ステップがことが原因として考えられた。また digital PCR 法は 700well で検討する形式に対し、後者ではコロニーピックアップ数が 100 個程度で検討していることも頻度の違いを生じる原因となっていると考えられる。

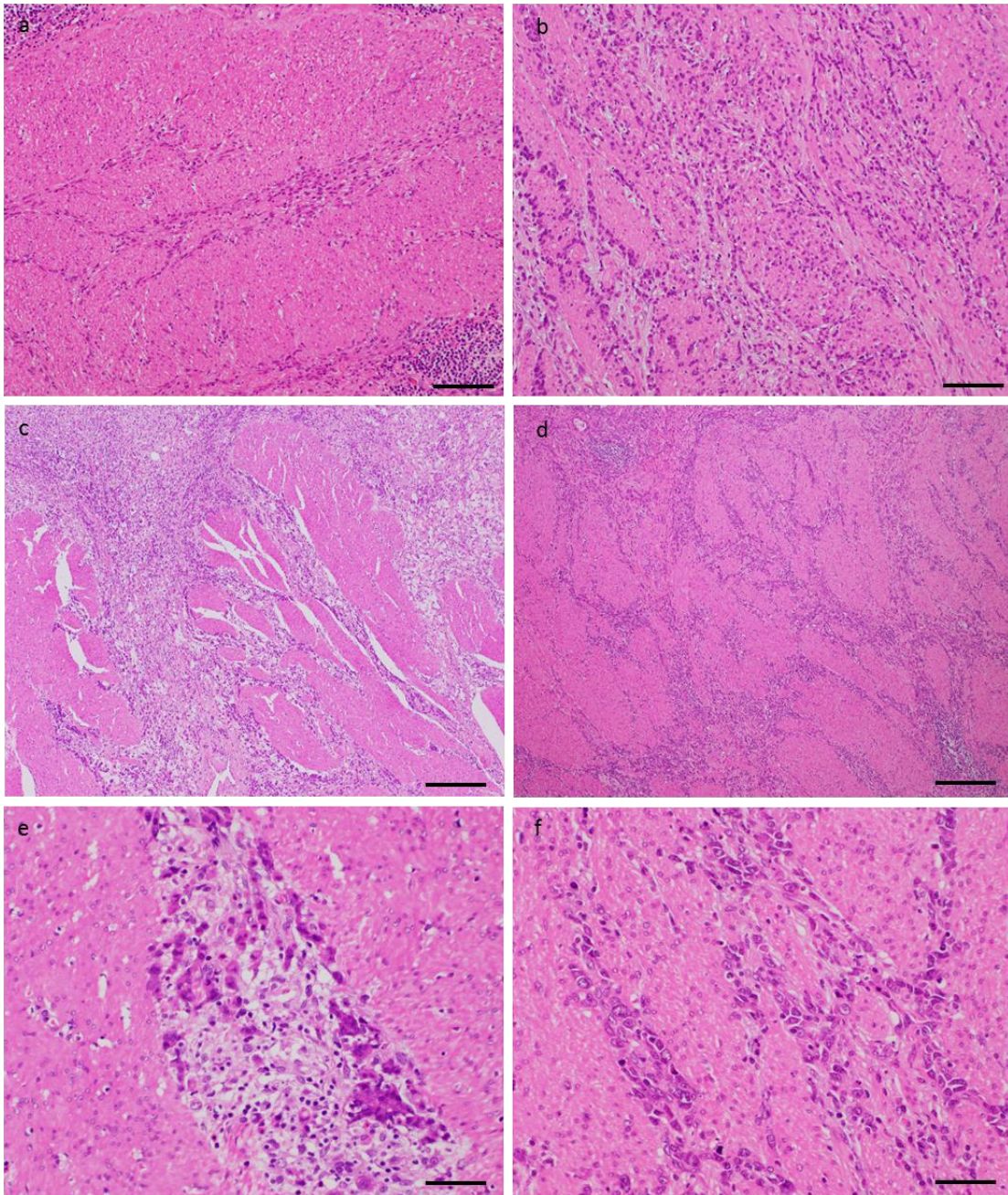


図 8 アメーバ様浸潤と網状浸潤のスコアリング

アメーバ様浸潤 (a, b) と網状浸潤 (c-d)を示している。(a)では腫瘍細胞が筋束間に浸潤するのみで筋束内に浸潤していないのでアメーバ様浸潤スコア 0 で、(b)では多数部位において筋束内に腫瘍細胞浸潤がみられスコア 3 となる。(c)では腫瘍細胞が粗な線維化を伴って筋層内に広く浸潤しており、網状浸潤スコア 0(e は c の拡大)。一方、(d)では粗大な線維化をほぼ伴わずに腫瘍細胞が筋層内に浸潤する部位が大部分で網状浸潤スコア 3 となる(f は d の拡大)。 黒色バー : (a, b)100µm、(c, d)250µm、(e, f)50µm

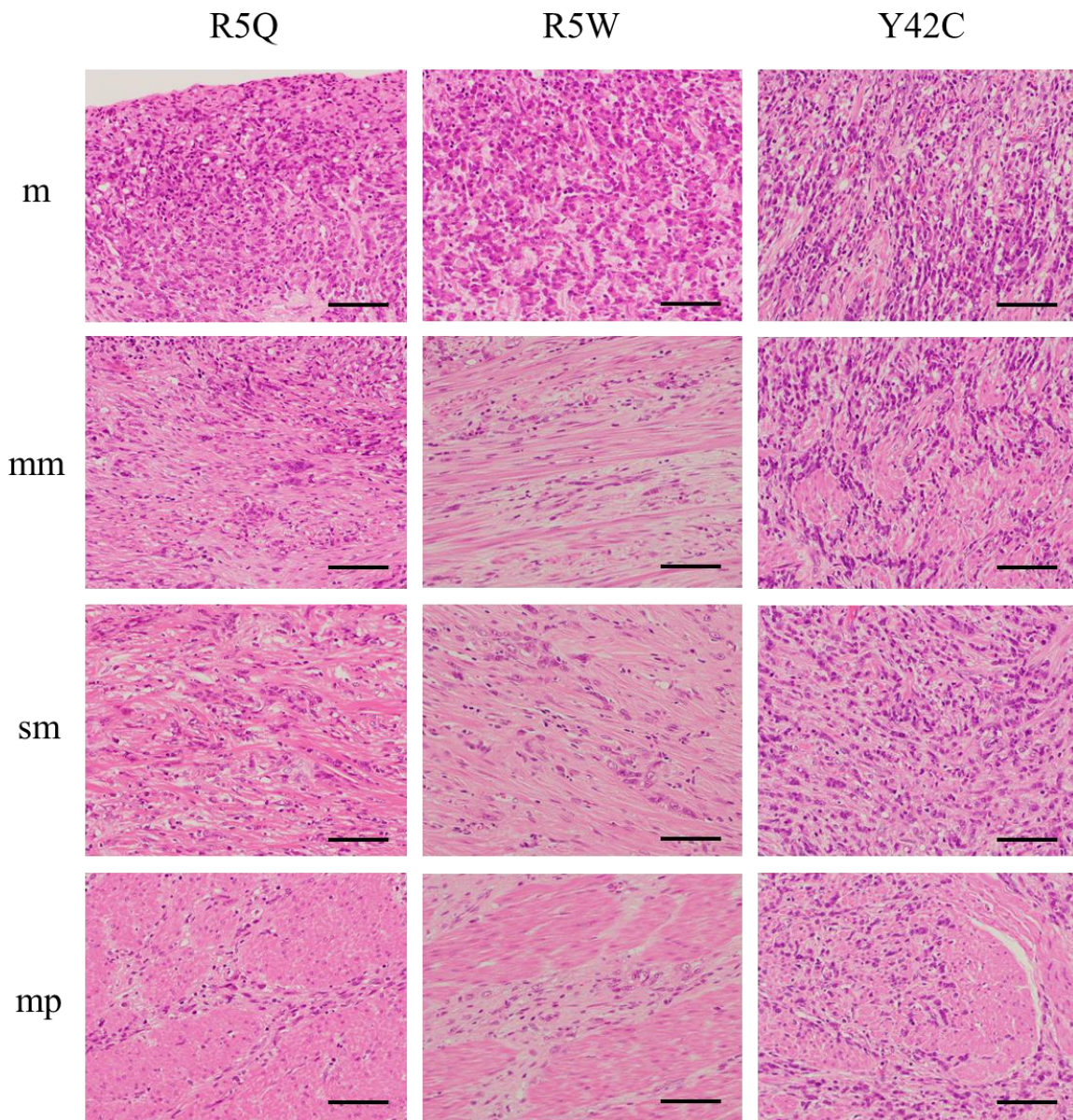


図9 R5Q, R5W, Y42C 変異例の浸潤パターン

各 RHOA 変異の代表例の写真を深さごとに提示している (R5Q; T124, R5W; GC342, Y42C; GC332)。Y42C 例は R5QW 例に対し細胞接着が緩く、間質反応に乏しい形で浸潤していく傾向がある。粘膜筋板内と固有筋層内において、Y42C 例は染み渡るように浸潤し、筋束内にまで腫瘍細胞が浸潤している。また線維化反応は乏しく、この浸潤パターンはアメーバ様浸潤に似ている。一方、R5QW 例のほとんどは筋束間に種々の程度に線維化と組織破壊を伴って浸潤しており、浸潤パターンの様相が異なる。線維化の程度は R5W がもっとも強いようにみえる。黒色バー：50μm

表2 びまん型胃癌統合解析結果

因子	RHOA野生型 (n=64)	RHOA Y42 または R5変異型 (n=20)	P 値
性別			0.795
男性	38	13	
女性	26	7	
平均年齢 (レンジ) (年)	64 (30-85)	62 (33-84)	0.633 <sup>a</sup>
部位			0.898
上部	16	6	
中部	27	8	
下部	21	6	
平均腫瘍サイズ (レンジ)(cm)	7.9 (1.5-22)	5.7 (2.2-13.5)	0.177 <sup>a</sup>
リンパ管侵襲			0.120
あり	42	9	
なし	22	11	
静脈侵襲			0.015
あり	46	8	
なし	18	12	
T因子			0.019
pT1-2	13	10	
pT3-4	51	10	
N因子			0.798
pN0	26	9	
pN1-3	38	11	
M因子			0.135
あり	18	2	
なし	46	18	
病理学的病期			0.305
I + II	28	12	
III + IV	36	8	

<sup>a</sup>Mann-Whitney U test

表3 本研究と先行研究のRHOA R5Q、R5W、Y42C変異症例のリスト

RHOA 変異	症例番号	年齢(年)	性別	部位	サイズ(cm)	組織型	深達度	リンパ管侵襲	静脈侵襲	リンパ節転移	遠隔転移	アメラバ様浸潤	網状浸潤	変異アレル頻度
R5Q	T124	59	男性	M	7	por, sig	pT4	+	+	+	-	1+	2+	0.099
R5Q	T174	67	男性	L	7.5	sig, por	pT3	-	-	+	-	n.a.	n.a.	0.12
R5Q	GC142	33	女性	U	4.2	por, sig	pT1a	-	-	-	-	n.a.	n.a.	0.039
R5Q	GC359*	47	男性	L	5	por, tub2	pT3	+	-	+	-	3+	2+	0.083
R5W	T118	48	男性	L	4.5	sig, por	pT3	+	-	+	-	1+	3+	0.075
R5W	T153*	54	男性	M	4	por	pT1b	-	-	-	-	n.a.	n.a.	0.043
R5W	GC15	57	男性	M	2.2	por2, sig	pT1a	-	-	-	-	n.a.	n.a.	0.01
R5W/R68P	GC16	84	女性	U	7.2	por	pT1a	-	-	-	-	n.a.	n.a.	0.02
R5W	GC73*	67	男性	L	5	por, tub2, sig	pT1a	-	-	-	-	n.a.	n.a.	0.41
R5W	GC307*	72	男性	L	6.5	por, muc, tub2	pT2	-	+	-	-	0	0	0.13
R5W	GC342	62	女性	M	4.5	por, sig, tub2	pT3	-	+	+	-	0	1+	0.19
Y42C	T191*	54	男性	U	5.4	por, sig	pT4	+	+	+	-	0	3+	0.093
Y42C	T219	42	女性	U	6	por, tub2	pT1b	-	-	-	-	n.a.	n.a.	0.14
Y42C	T232*	43	女性	M	3.2	por, tub2	pT1b	-	-	-	-	n.a.	n.a.	0.22
Y42C	GC286	72	男性	M	2.5	por, sig	pT1b	-	-	-	-	n.a.	n.a.	0.08
Y42C	GC299*	78	男性	U	2.8	por, sig, tub2	pT1b	+	-	+	-	n.a.	n.a.	0.19
Y42C	GC313	82	男性	L	7	por, sig, tub2	pT4	+	+	+	+	2+	3+	0.17
Y42C	GC315*	63	女性	M	7.5	por, tub2	pT4	+	+	+	-	3+	1+	0.13
Y42C	GC332	75	女性	M	8	por, sig	pT4	+	+	+	-	3+	2+	0.2
Y42C	GC383	78	男性	U	13.5	por	pT4	+	+	+	+	2+	2+	0.009

U, 胃上部; M, 胃中部; L, 胃下部; tub2, 中分化型腺癌; por, 低分化型腺癌; sig, 印環細胞癌;

\*, 腫瘍内不均一性解析に使用した症例; n.a., not assessed



表4 RHOA R5Q、R5W、Y42C変異群間の臨床病理学的解析結果

因子	R5Q	R5W	Y42C	P 値
性別(男性/女性)				0.848
男性	3	5	5	
女性	1	2	4	
平均年齢(レンジ)(年)	51.5 (33-67)	63.4 (48-54)	65.2 (42-82)	0.324 <sup>†</sup>
部位				0.522
上部	1	1	4	
中部	1	3	4	
下部	2	3	1	
平均腫瘍サイズ(レンジ)(cm)	5.9 (4.2-7.5)	4.8 (2.2-7.2)	6.2 (2.5-13.5)	0.536 <sup>†</sup>
リンパ管侵襲				0.133
あり	2	1 <sup>§</sup>	5 <sup>§</sup>	
なし	2	6 <sup>§</sup>	4 <sup>§</sup>	
静脈侵襲				0.501
あり	1	2	5	
なし	3	5	4	
深達度1				0.395
pT1-2	1	5	4	
pT3-4	3	2	5	
深達度2				0.102
pT1a	1	3 <sup>‡</sup>	0 <sup>‡</sup>	
pT1b-4	3	4 <sup>‡</sup>	9 <sup>‡</sup>	
リンパ節転移				0.300
pN0	1	5	3	
pN1-3	3	2	6	
M因子				0.669
あり	0	0	2	
なし	4	7	7	
病理学的病期				0.501
I + II	3	5	4	
III + IV	1	2	5	
アメーバ様浸潤*				0.17
0 ~ 1+	1	3 <sup>  </sup>	1 <sup>  </sup>	
2+ ~ 3+	1	0 <sup>  </sup>	4 <sup>  </sup>	
網状浸潤*				0.33
0 ~ 1+	0	2	1	
2+ ~ 3+	2	1	4	

\*、進行癌のみ評価した; †, Kruskal-Wallis test; ‡, P=0.063; §, P=0.060; ||, P=0.143.

### 3. *RHOA* 変異の腫瘍内分布

*RHOA* 変異例 8 例の腫瘍中心部、辺縁部をレーザーマイクロダイセクションで選択的に採取し、dPCR で解析した結果、背景粘膜を除くすべての部位に *RHOA* 変異が認められた(表 5)。早期癌において粘膜下腫瘍病変のみならず、粘膜内病変も *RHOA* 変異を有していた(図 10)。進行癌では肉眼的・顕微鏡的に離れている表層部、深部、辺縁部すべてに変異が認められ、リンパ節転移部にも *RHOA* 変異が確認された(図 11)。同一症例で組織学的に異なる成分について検討したが、低分化腺癌以外の成分、即ち中分化腺癌、粘液癌、印環細胞癌病変部においても *RHOA* 変異が確認された(表 5)。次に Mutant allele index (MAI) を抗 AE1/AE3 抗体染色スライドを画像解析ソフトで解析して得られた腫瘍比率をもとに計算した(図 12、表 5)。MAI を腫瘍の部位別、深達度別に並べると図 13 のようになる。進行癌 4 例の内、3 例において粘膜病変から深部浸潤部病変に向かって変異アレル頻度が上昇していた。リンパ節転移巣についても検討できた GC315 では、リンパ節転移巣においても変異アレル頻度の上昇が原発巣粘膜病変に対して認められた(表 5)。

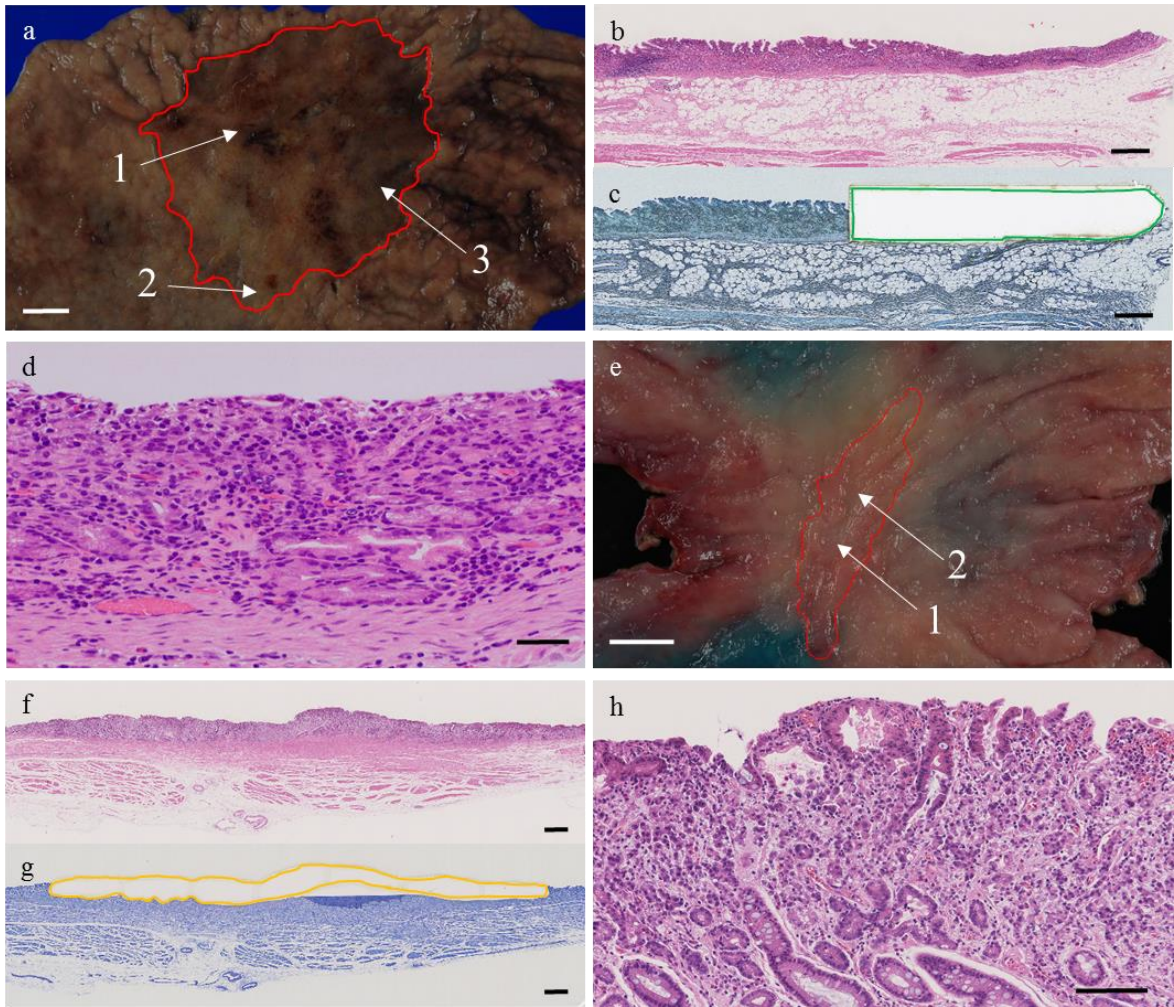


図 10 早期癌における RHOA 変異分布

早期癌の変異分布解析代表例を示す(T153: a-d, GC73: e-h)。(a)と(e)はそれぞれの症例の肉眼像で矢印はサンプル採取部位を示す。赤実線は腫瘍範囲を示す。(b, c)(f, g)は腫瘍部のレーザーマイクロダイセクション前後の写真。(d)と(h)は腫瘍部拡大写真。いずれの早期癌においても RHOA 変異がすべての部位に検出された。バーはそれぞれ以下の長さを示す:(a, e)1cm、(b, c, f, g)500µm、(d, h)100µm

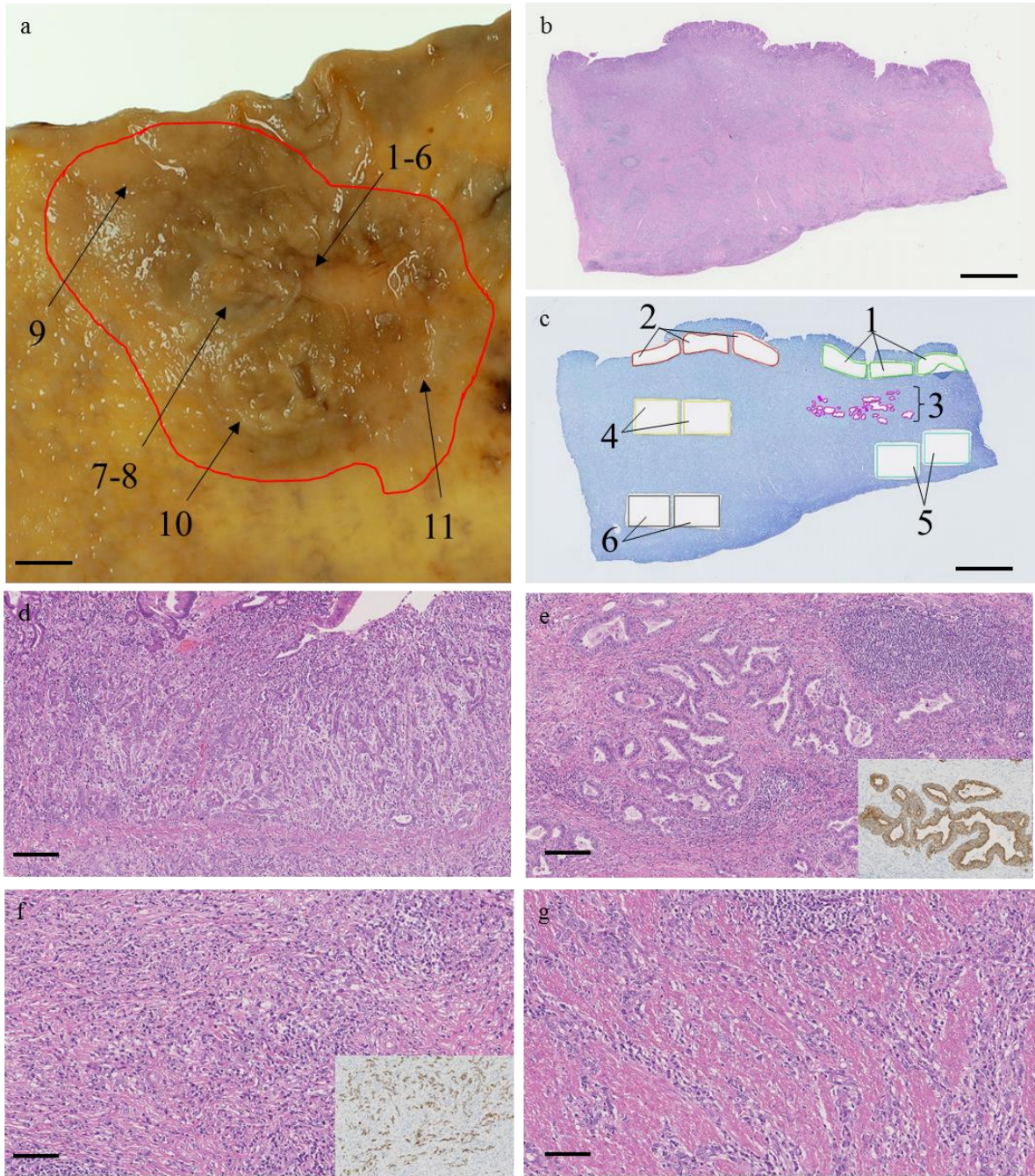


図 11 進行癌における RHOA 変異分布

進行癌における RHOA 変異分布代表例を示す(GC315)。(a)腫瘍の肉眼写真で、赤実線で腫瘍範囲を示している。サンプル採取部位を矢印で示している。(b)と(c)はレーザーマイクロダイセクション前後の写真で、数字はサンプル番号を示す。破線は予測されるクラスター範囲を表す。また粘膜固有層(d)、粘膜下層(中分化型腺癌を伴う部位、インセットは抗 AE1/AE3 抗体染色)(e)、粘膜下層(低分化腺癌部、インセットは抗 AE1/AE3 抗体)(f)、固有筋層部(g)が示されている。バーはそれぞれ以下の長さを示す：(a)1cm、(b、c)2mm、(d-g)100 $\mu$ m

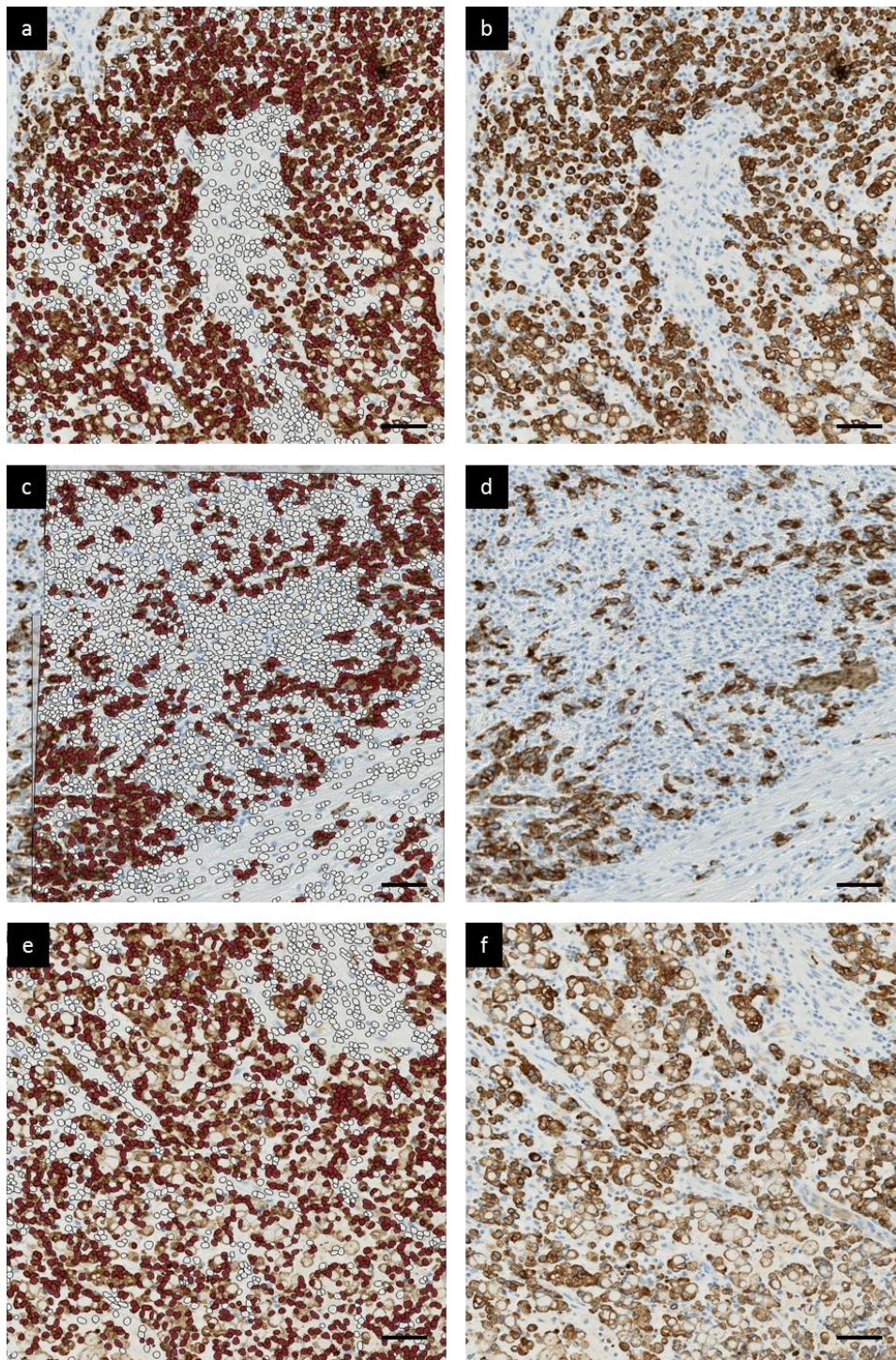


図 12 抗 AE1/AE3 抗体陽性細胞の Tissue studio による解析結果

(a)と(b)、(c)と(d)、(e)と(f)はそれぞれ Tissue studio の解析結果と解析前の元の写真を示している。(a,c,e)の赤丸は AE1/AE3 陽性と認識された細胞を示し、白丸は陰性と認識された細胞を示す。ほとんどの陽性細胞が正しく認識され、カウントされている。  
 黒色バー：50 $\mu$ m

### 各部位の変異アレル頻度上昇について

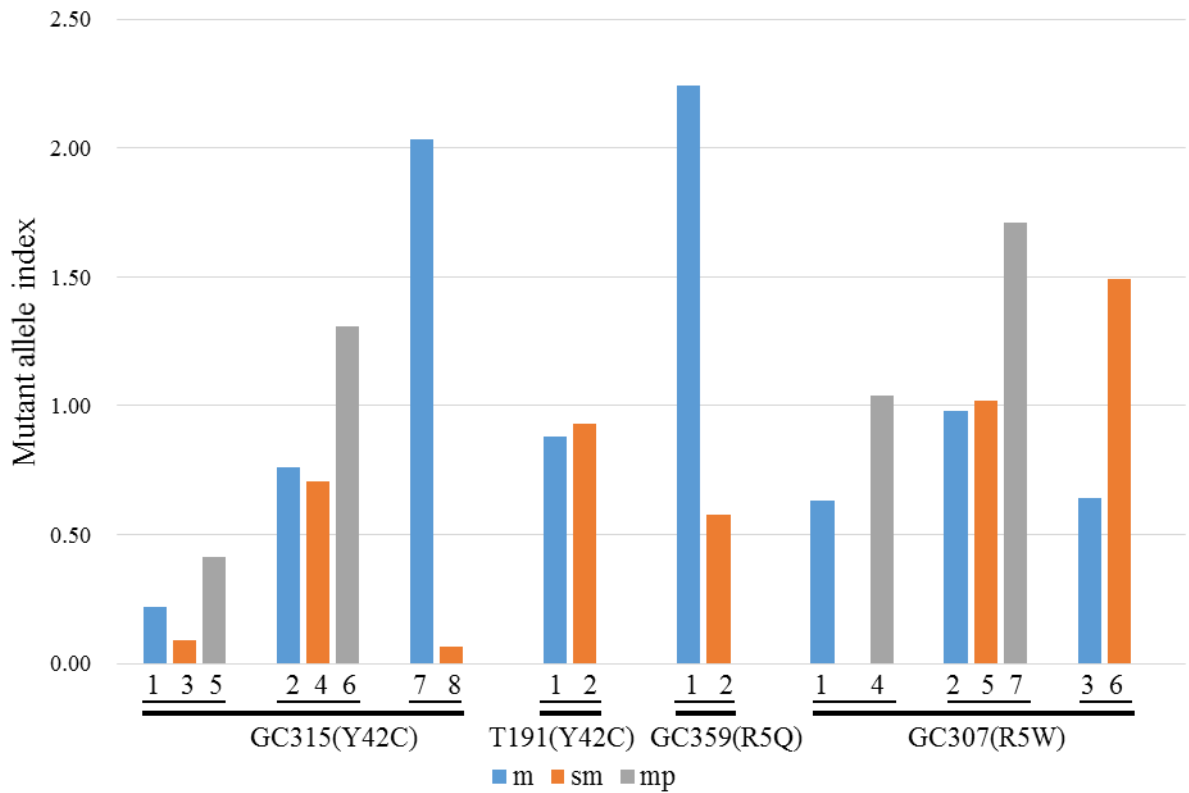


図 13 各部位の変異アレル頻度上昇について

粘膜内病変、その直下の粘膜下層病変、固有筋層病変の変異アレル頻度解析結果をそれぞれの場所ごとに棒グラフで示している。進行癌 4 例の内、3 例において深部浸潤部に向かって変異アレル頻度の上昇がみられる。腫瘍の進展、浸潤に変異型 RHOA 蛋白質が重要と考えられる。

表5 RHOA変異腫瘍内分布解析結果

病期	RHOA 変異	症例 番号	Sub No	腫瘍内位置	採取部	組織型	RHOA 変異有無	Mutant allele index	Allelic imbalance値	FISH	
										Loss of RHOA	異数性
早期癌	Y42C	GC299	1	中心部	m	tub2	+	1.39	2.70	+	+
			2	中心部	m	por	+	0.82	1.60	n.d.	n.d.
			3	中心部	sm	por	+	0.37	1.02	n.d.	n.d.
			4	辺縁部	m	sig	+	1.41	2.30	+	+
			5	背景粘膜	m	-	-	0.00	1.16	n.d.	n.d.
	T232	1	中心部	m	tub2	+	1.03	2.40	+	-	
		2	中心部	sm	por	+	0.97	2.00	n.i.	n.i.	
		3	背景粘膜	m	-	-	0.00	1.00	n.d.	n.d.	
	R5W	GC73	1	中心部	m	por	+	1.07	1.45	n.d.	n.d.
			2	中心部	m	por, sig	+	0.93	1.33	+	-
			3	背景粘膜	m	-	-	0.00	1.05	n.d.	n.d.
		T153	1	中心部	m to sm	por	+	0.92	1.01	n.d.	n.d.
			2	辺縁部	m	por	+	1.00	1.50	n.i.	n.i.
			3	辺縁部	m	por	+	1.08	1.01	n.d.	n.d.
			4	背景粘膜	m	-	-	0.00	1.02	n.d.	n.d.
		進行癌	Y42C	GC315	1	中心部	m	tub2	+	0.76	1.07
2	中心部				m	tub2	+	0.22	1.03	-	-
3	中心部				sm	tub2	+	0.71	1.01	-	+
4	中心部				sm	por	+	0.09	1.29	+	-
5	中心部				mp	por	+	1.31	1.05	+	-
6	中心部				mp	por	+	0.42	1.36	+	-
7	辺縁部				m	tub2	+	2.03	1.07	-	-
8	辺縁部				sm	por	+	0.07	1.15	+	-
9	辺縁部				sm	por	+	0.81	1.16	n.d.	n.d.
10	辺縁部				sm	por	+	2.14	1.20	n.d.	n.d.
11	辺縁部				sm	por	+	1.70	1.09	n.d.	n.d.
12	原発巣外				腹部LN	por	+	1.76	2.27	+	+
13	背景粘膜				m	-	-	0.00	1.03	n.d.	n.d.
T191	1		中心部	m	por	+	0.88	n.d.	+	-	
	2		中心部	sm	por	+	0.93	n.d.	n.d.	n.d.	
	3		辺縁部	sm	por	+	1.58	n.d.	n.d.	n.d.	
	4		辺縁部	sm	por	+	0.61	n.d.	n.d.	n.d.	
	5		背景粘膜	m	-	-		n.d.	n.d.	n.d.	
R5Q	GC359		1	中心部	m	por	+	2.24	1.75	+	-
			2	中心部	sm	por	+	0.58	1.13	+	-
			3	辺縁部	mp	por	+	0.77	1.02	n.d.	n.d.
			4	辺縁部	mp	por	+	0.67	1.01	n.d.	n.d.
			5	辺縁部	mp	por	+	0.73	1.05	n.d.	n.d.
		6	背景粘膜	m	-	-	0.00	1.02	n.d.	n.d.	
R5W	GC307	1	中心部	m	tub2	+	0.63	1.07	n.i.	n.i.	
		2	中心部	m	tub2	+	0.98	1.08	-	-	
		3	中心部	m	muc	+	0.64	1.02	-	-	
		4	中心部	sm	muc	+	1.04	1.11	n.i.	n.i.	
		5	中心部	sm	por	+	1.02	1.04	-	-	
		6	中心部	sm	muc	+	1.49	1.02	-	-	
		7	中心部	mp	por	+	1.71	1.05	-	-	
		8	辺縁部	m	tub2	+	0.97	1.11	n.d.	n.d.	
		9	辺縁部	sm	muc	+	0.53	1.25	n.d.	n.d.	
		10	背景粘膜	m	-	-	0.00	1.02	n.d.	n.d.	

m, 粘膜固有層; sm, 粘膜下層; LN, リンパ節; tub2, 中分化型腺癌; por, 低分化型腺癌; sig, 印環細胞癌; muc, 粘液癌  
n.d., not done; n.i., not informative

#### 4. Allelic imbalance 解析、*RHOA* FISH 解析

腫瘍内不均一性解析対象の 8 例中、三番染色体上の一塩基遺伝子多型 SNP1、2 が背景粘膜においてヘテロ接合体であったのは T191 を除いた 7 例であった。これらの症例に対し allelic imbalance 解析を実施し、SNP1、2 のアレル比 (AIV)、VIC/FAM カウント比を表 6、図 14 にまとめた。また AIV 平均値は表 5 に記載した。また解析ソフトを使用した結果の 1 例を図 15 に示した。殆どの背景粘膜の AIV は 1.00-1.05(平均 1.042、標準偏差 0.05411) であった。ここで背景粘膜 AIV の平均値+3SD を超える AIV (すなわち 1.2) を allelic imbalance ありと仮定したところ、検索した 7 例すべての腫瘍部で allelic imbalance が認められ、その内 5 例は粘膜内病変部であった。進行癌浸潤部では 4 例中 3 例に allelic imbalance がみられた。また各々の症例内で FAM シグナルカウント数と VIC シグナル数の比が 1 を跨いで入れ替わることはなかった(図 14)。FAM と VIC シグナルはそれぞれアレル特異的シグナルであるので、この結果は同一症例内においては常に特定のアレルが増減していることを示唆していると考えられた。

*RHOA* FISH 解析について、*RHOA* locus の LOH は GC307 を除いて、すべての症例にみられた。表 5 に判定結果、表 6 にシグナルカウント結果、代表例を図 16 に示した。また AIV が高値を示す病変では異数性が認められた(GC299-



1、4、GC315-12)。1か所(GC315-3)において、AIVが1.01と背景粘膜炎とほぼ変わらないにも関わらず、異数性の認められた部位があった。

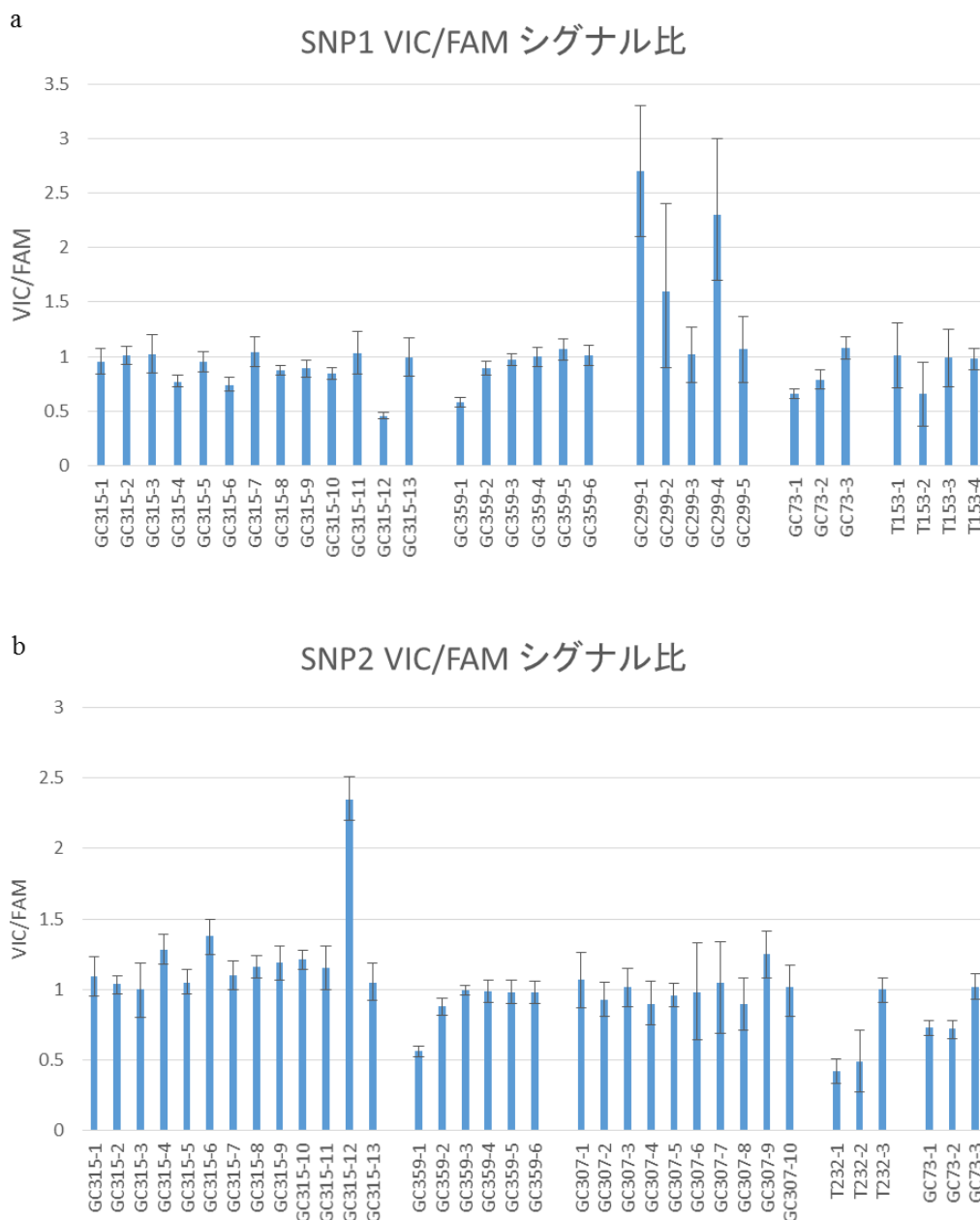


図 14 SNPs の VIC/FAM シグナル比結果

SNPs 解析によって得られて VIC/FAM シグナルの比を示す(bar は 95%信頼区間)。各症例内において、VIC/FAM 比が 1 を跨いで変化するのは 1 例もみられない。これは常に同一のアレルが増加あるいは減少していることを示唆している。

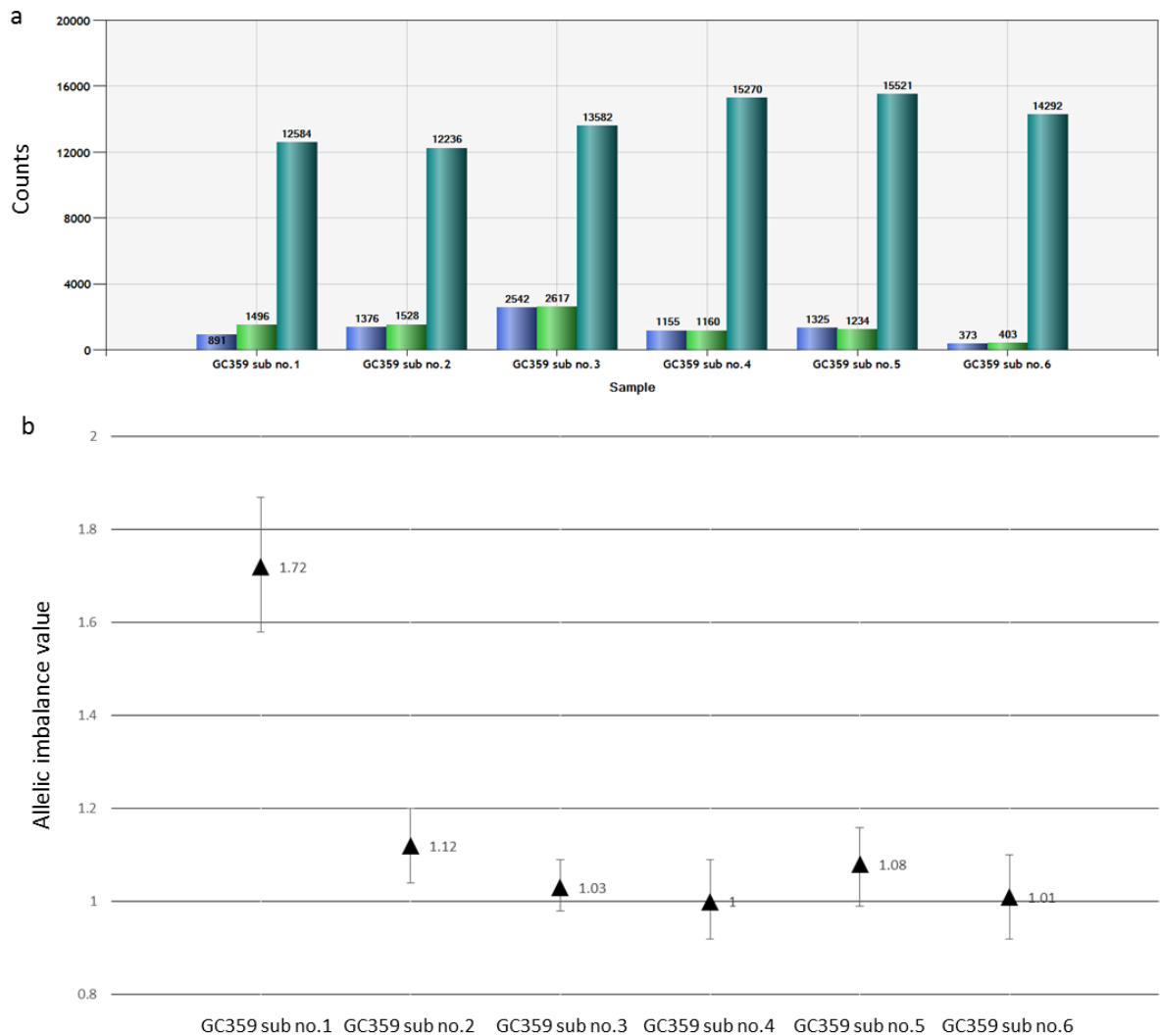


図 15 Droplet digital PCR による SNPs 解析結果の 1 例

SNPs 解析の代表例を示す(GC359)。(a)各サンプルごとに棒グラフがまとめて表示されている。それぞれのサンプルにおいて、右端の濃いグリーンで表示されている棒グラフがカウントされた全 droplet で、その内 FAM シグナルが陽性であったものの数が青棒グラフ、VIC 陽性であったものが明るいグリーンの棒グラフで示されている。棒グラフ上に表示される数値は実際のカウント数である。すべてのサンプルで PCR が十分に行われ、10000 個以上の droplet がカウントされている。(b)では(a)の結果をもとに、メジャーアレル数/マイナーアレル数比を示している(bar は 95%信頼区間)。

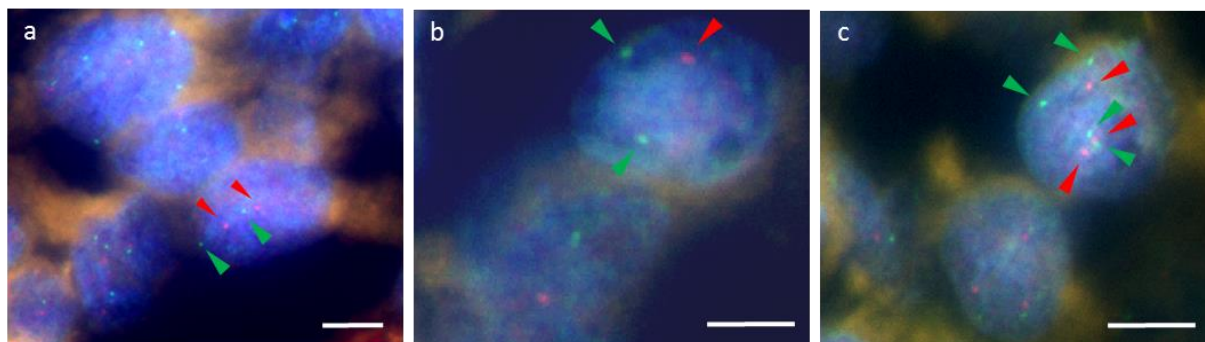


図 16 RHOA FISH 結果

RHOA FISH 結果を示す。正常核型では RHOA(赤)シグナル 2 個、3 番染色体セントロメア(緑)シグナル 2 個が 1 個の核内にみられる(a)。LOH(RHOA 遺伝子座)については、赤シグナル 1 個、緑シグナル 2 個となるものをカウントした(b)。異数体は 1 個の核内に赤シグナルまたは緑シグナルが 3 個以上みられた場合にカウントした(c)。赤矢頭：RHOA シグナル、緑矢頭：セントロメアシグナル。白色バー：5 $\mu$ m

表6 SNPs解析結果

Sample No	Sub No.	Locus	SNP1		SNP2	
			AIV (95% C.I.)	VIC / FAM (95% C.I.)	AIV (95% C.I.)	VIC / FAM (95% C.I.)
GC315	1	m	1.05 (0.92-1.18)	0.95 (0.84-1.07)	1.09 (0.95-1.23)	1.09 (0.95-1.23)
	2	m	1.01 (0.93-1.09)	1.01 (0.93-1.09)	1.04 (0.97-1.1)	1.04 (0.97-1.1)
	3	sm	1.02 (0.85-1.2)	1.02 (0.85-1.2)	1 (0.8-1.19)	1 (0.8-1.19)
	4	sm	1.29 (1.21-1.38)	0.77 (0.72-0.83)	1.28 (1.18-1.39)	1.28 (1.18-1.39)
	5	mp	1.05 (0.95-1.16)	0.95 (0.86-1.04)	1.05 (0.97-1.14)	1.05 (0.97-1.14)
	6	mp	1.34 (1.23-1.46)	0.74 (0.68-0.81)	1.38 (1.25-1.5)	1.38 (1.25-1.5)
	7	m	1.04 (0.91-1.18)	1.04 (0.91-1.18)	1.1 (1-1.2)	1.1 (1-1.2)
	8	sm	1.14 (1.08-1.2)	0.877 (0.832-0.922)	1.16 (1.08-1.24)	1.16 (1.08-1.24)
	9	sm	1.12 (1.02-1.22)	0.89 (0.81-0.97)	1.19 (1.07-1.31)	1.19 (1.07-1.31)
	10	sm	1.18 (1.1-1.26)	0.84 (0.79-0.9)	1.21 (1.14-1.28)	1.21 (1.14-1.28)
	11	sm	1.03 (0.84-1.23)	1.03 (0.84-1.23)	1.15 (0.92-1.19)	1.15 (1-1.31)
	12	LN	2.19 (2.06-2.31)	0.457 (0.431-0.483)	2.35 (2.2-2.51)	2.35 (2.2-2.51)
	13	背景粘膜	1.01 (0.91-1.12)	0.99 (0.82-1.17)	1.05 (0.92-1.19)	1.05 (0.92-1.19)
GC359	1	m	1.72 (1.58-1.87)	0.58 (0.532-0.628)	1.78 (1.67-1.9)	0.561 (0.525-0.597)
	2	sm	1.12 (1.04-1.2)	0.89 (0.83-0.96)	1.14 (1.06-1.22)	0.88 (0.82-0.94)
	3	sm-mp	1.03 (0.98-1.09)	0.97 (0.92-1.02)	1.006 (0.96-1.05)	0.994 (0.96-1.029)
	4	sm-mp	1 (0.92-1.09)	1 (0.91-1.08)	1.01 (0.93-1.09)	0.99 (0.91-1.07)
	5	sm-mp	1.08 (0.99-1.16)	1.07 (0.97-1.16)	1.02 (0.93-1.1)	0.98 (0.9-1.07)
	6	背景粘膜	1.01 (0.92-1.1)	1.01 (0.92-1.1)	1.02 (0.94-1.11)	0.98 (0.9-1.06)
GC307	1	m	n.d.	n.d.	1.07 (0.87-1.26)	1.07 (0.87-1.26)
	2	m	n.d.	n.d.	1.08 (0.94-1.22)	0.93 (0.81-1.05)
	3	m	n.d.	n.d.	1.02 (0.88-1.15)	1.02 (0.88-1.15)
	4	sm	n.d.	n.d.	1.11 (0.92-1.3)	0.9 (0.75-1.06)
	5	sm	n.d.	n.d.	1.04 (0.95-1.13)	0.96 (0.88-1.04)
	6	sm	n.d.	n.d.	1.02 (0.66-1.37)	0.98 (0.64-1.33)
	7	mp	n.d.	n.d.	1.05 (0.79-1.3)	1.05 (0.69-1.34)
	8	m	n.d.	n.d.	1.11 (0.93-1.29)	0.9 (0.71-1.08)
	9	sm	n.d.	n.d.	1.25 (1.08-1.41)	1.25 (1.08-1.41)
	10	背景粘膜	n.d.	n.d.	1.02 (0.89-1.15)	1.02 (0.81-1.17)
GC299	1	m	2.7 (2.1-3.3)	2.7 (2.1-3.3)	n.d.	n.d.
	2	m	1.6 (0.9-2.4)	1.6 (0.9-2.4)	n.d.	n.d.
	3	sm	1.02 (0.76-1.27)	1.02 (0.76-1.27)	n.d.	n.d.
	4	m	2.3 (1.7-3)	2.3 (1.7-3)	n.d.	n.d.
	5	背景粘膜	1.16 (0.86-1.46)	1.07 (0.76-1.37)	n.d.	n.d.
T232	1	m	n.d.	n.d.	2.4 (1.9-2.9)	0.42 (0.33-0.51)
	2	sm	n.d.	n.d.	2 (1.1-2.9)	0.49 (0.27-0.71)
	3	背景粘膜	n.d.	n.d.	1 (0.92-1.09)	1 (0.91-1.08)
GC73	1	m	1.52 (1.43-1.62)	0.657 (0.616-0.698)	1.38 (1.27-1.48)	0.73 (0.67-0.78)
	2	m	1.27 (1.12-1.42)	0.79 (0.7-0.88)	1.39 (1.26-1.58)	0.72 (0.65-0.78)
	3	背景粘膜	1.08 (1-1.16)	1.08 (0.98-1.18)	1.02 (0.93-1.11)	1.02 (0.93-1.11)
T153	1	m	1.01 (0.71-1.31)	1.01 (0.71-1.31)	n.d.	n.d.
	2	m	1.5 (0.8-2.2)	0.66 (0.36-0.95)	n.d.	n.d.
	3	m	1.01 (0.75-1.27)	0.99 (0.72-1.25)	n.d.	n.d.
	4	背景粘膜	1.02 (0.92-1.12)	0.98 (0.88-1.07)	n.d.	n.d.

m, 粘膜固有層; sm, 粘膜下層; mp, 固有筋層; LN, リンパ節; n.d., not done

表7 *RHOA* FISH結果

Sample name	Loss of <i>RHOA</i> (%)	異数性(%)
T191-1	15.7	3.9
T232-1	34	4
GC73-2	63.6	0
GC299-1	17.6	25
GC299-4	40	15.3
GC307-2	8	0
GC307-3	3.6	0
GC307-5	7.5	0
GC307-6	8	4
GC307-7	5.5	3.6
GC315-1	9.4	0
GC315-2	0.04	0.06
GC315-3	5.5	12.7
GC315-4	15.3	6.9
GC315-5	14.5	2.9
GC315-6	26.9	7.7
GC315-7	1.8	5.4
GC315-8	18.5	3.6
GC315-12	13.3	10.5
GC359-1	25.8	6.1
GC359-2	33.3	3.3

## 第4節 考察

### 1. *RHOA* 変異胃癌の臨床病理学的特徴について

胃癌は2014年に発表されたTCGA研究によると、EBV関連型、マイクロサテライト不安定型(MSI)、染色体不安定型(CIN)、ゲノム安定型(GS)の4型に分類される(12)。びまん型胃癌の多くがGS型胃癌に分類され、コピー数異常が他の3型と比較すると少なく、ゲノム変異数も少ない傾向にある。しかし、GS型胃癌には*CDH1*変異、*RHOA*変異、次章で述べる*CLDN18-ARHGAPs*転座が特に多く認められ、これらの遺伝子異常がびまん型胃癌の臨床病理学的特徴に強く寄与していると考えられる。

本研究で我々は*RHOA*変異がびまん型胃癌に特異的であることを再確認した。またY42C、R5変異の頻度は5.7%(7例/びまん型胃癌123例)で、先行研究の同変異頻度〔5.5%(10)、7.4%(12)(GS型における頻度)、14.9%(11)〕と大きな違いはなかった。

先行研究との統合解析(表2)では*RHOA*変異群(Y42C、R5Q、R5W)により早期の癌(pT1-2)と静脈侵襲陰性例が多かったが、これはR5W変異例で早期の癌が多いことが関連していると考えられた。実際*RHOA*変異群からR5Wを除いて解析すると深達度、静脈侵襲はともに有意差が消失した〔(*RHOA* wild vs Y42C、R5Q)それぞれP=0.169、0.104〕。なお絶対的な症例数が少ないため、

さらに多くの症例で *RHOA* 変異有無と臨床病理学的因子の相関について検討を進める必要がある。

次に先行研究と本研究で明らかになった Y42C、R5Q/W の *RHOA* 変異胃癌 20 症例を用いた統合解析(表 4)では、Y42C 変異例は R5W 例と比較し、より悪性の高い性質、即ちより深く、染み渡るように浸潤し、リンパ管侵襲をきたしやすい傾向が認められた。また我々の 210 例の統合解析(本研究 123 例と先行研究 87 例)では R5W 変異例が 7 例発見されており、その多くが早期癌であった。この結果から深達度という点においては、R5W 変異例は粘膜の浅い部位に留まる症例が多く、このような特徴を有するため早期癌症例の少ない他の研究報告では R5W 変異例報告が少数であったと推測された(10, 12)。文献 12 では 199 例中 15 例、文献 10 では 295 例中 11 例であるが、本研究ではびまん型胃癌 123 例中 75 例、文献 11 ではびまん型胃癌 87 例中 16 例が早期癌であった。他の原因としては人種による遺伝的背景の違い、暴露環境因子の違いなどが考えられる。なお R5W 変異の進行癌も Y42C 変異例と比較すると少ないながらも存在し、腫瘍内均一性解析によってすべての部位に R5W 変異が確認され、さらに深部浸潤部において変異アレル頻度上昇が確認されたことを考慮すると、R5W 変異も他の変異と同様にドライバー変異であると考えられる。

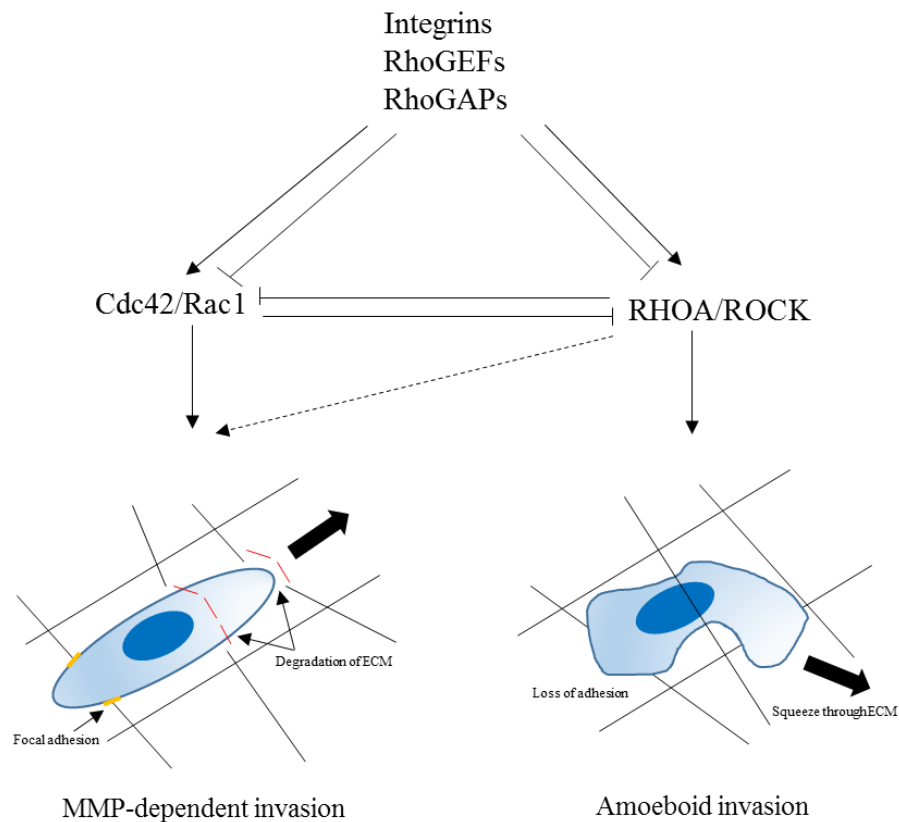


図 17 細胞浸潤パターン

アメーバ様浸潤と matrix metalloprotease(MMP)-dependent invasion は RHOA/ROCK と Cdc42/Rac1 のバランスで制御されている。これらの因子を調整する上流の因子としては種々の RhoGEFs、RhoGAPs、Integrins があり複雑に支配されている。Cdc42/Rac1 が優勢の場合は、MMP 発現し周囲間質を分解・破壊しながら遊走し、逆に RHOA/ROCK 優勢の場合は間質との接着性を低下させ、破壊せずすり抜けるように浸潤するとされている。ECM: Extracellular matrix

近年、細胞の浸潤様式は主としてアメーバ様浸潤と Matrix

metalloprotease(MMP)-依存性浸潤の 2 パターンをとるとされている(図 17)。前

者は actomyosin 収縮、細胞間質間接着の消失を介して、間質を破壊せずにすり

に抜けるように移動するもので、RHOA-ROCK pathway によって制御されてい

る(28, 29)。後者は Rac1、cdc42 に誘導される podosome/invadopodia 形成、MMP



によって調節されており、両者は互いにバランスを取り合っている(38, 39)(図17)。また活性化型 RHOA(G14V)がアメーバ様浸潤を促進するだけでなく、podosome 形成をも促進するとの報告もある(40)。さらにインテグリン由来のシグナルにより FAK が活性化され、Rac1 活性化を介して活性化型 RHOA のレベルを下げ、細胞浸潤能を制御していることが報告されている(41-43)。以上のことから、細胞がとる浸潤パターンは少なくとも活性化型 RHOA、ROCK、Rac1、cdc42、周囲環境(インテグリン発現種類等)の影響を受けていると考えられる。

*In vitro* 実験系では、Y42C 変異型 RHOA は野生型 RHOA、活性化型

RHOA(G14V)と比較し、GDP 結合型の不活性化型が多いことが示されている

(10)。不活性化型の RHOA を有する Y42C 変異例が固有筋層においてアメーバ様浸潤の像を示し、粘膜下層では MMP-依存性の浸潤形式を示すことは一見上記の報告と矛盾するようにみえるが、間質を構成する物質組成の違いによるものかもしれない。一方、R5 変異型 RHOA の GTP-loading 状態を野生型と比較し、機能解析を行った報告は現在ないが、RHOA 変異種類による浸潤パターン形式が異なるという傾向と上記のアメーバ様浸潤と MMP-依存性浸潤を制御する重要な経路の一つが RHOA-pathway であることを考慮すると、R5 領域の異常が RHOA 機能に影響を与えている可能性がある。なお本研究では評価対象とされていないが、先行研究で判明している G17E 変異 3 症例の内、2 例で評価に

耐える標本がありアメーバ様浸潤を追加検討したところ、同浸潤パターンが程度の差はあるが、いずれの症例にも認められた(アメーバ様浸潤スコア 1 と 3)。G14E 変異については恒常活性型とされており、この結果は RHOA/ROCK シグナル経路が活性化することによりアメーバ様浸潤が促進されるという考えと合致する。

しかしながら胃癌症例及び胃癌細胞株における *RHOA* 変異蛋白質の活性状態と浸潤能、転移能との関係については少数の検討しかなく、今後 R5 変異や Y42C 変異型 *RHOA* の機能解析を含む詳細な研究が期待される。

## 2. *RHOA* 変異胃癌における腫瘍内均一性について

*RHOA* 変異胃癌を対象とした均一性検討の結果、粘膜内病変から深部浸潤部まですべての病変部に *RHOA* 変異が認められ、組織学的に腫瘍内での割合が低かった成分の中分化腺癌や粘液癌成分等にも同一の変異が確認できた。これらの結果は腫瘍発生において *RHOA* 変異が早期に生じた事象であることを示唆している。さらに深部浸潤部、リンパ節転移巣において変異アレル頻度の上昇がみられたことから、変異型 *RHOA* 蛋白質は腫瘍の進展・浸潤にも重要な役割を担っていると考えられた。変異アレル頻度の上昇がみられた部位では種々の程度に *RHOA* 遺伝子座の LOH や異数性により引き起こされたアレル不均衡が確

認され、腫瘍細胞ゲノムの多様性増加の一部をみていると考えられた。SNPs 解析では、各々の解析例内での VIC/FAM シグナル比の明らかな逆転はみられず、同一の症例で常にどちらか一方アレルが増加あるいは減少している可能性が示唆された。これは腫瘍細胞の生存にとって有利な特定のアレルが選択されている可能性も示唆しているが、二か所の SNPs でのみ評価しているため、3 番染色体全体を認識するような FISH プローブあるいは array CGH 等のゲノム全体を包括的に評価できる系でこの現象を再確認する必要があると考えられる。

本研究では *RHOA* 変異に注目し詳細にその分布を調べ腫瘍内均一性に関する一つの知見を提示した。包括的な胃癌の分子生物学的な発生進化については WGS や一細胞シーケンス等の研究によりかなり早期の段階から遺伝的多様性がみられることが明らかになりつつあるが、いまだ詳細な全貌はわかっておらず今後の研究が期待される(44-46)。

### 第3章 びまん型胃癌における転座の臨床病理学的解析

#### 第1節 背景と目的

近年、次世代シーケンサーを使用し多数例の胃癌のゲノム変化を解析した報告が相次いだ(10-14, 47)。これら報告の中で TCGA (12)と Yao ら(47)は *CLDN18-ARHGAPs* 転座が胃癌に繰り返し見られることを初めて報告した。この2報以外でこの転座に関する報告は現在のところない。TCGA のデータでは *CLDN18-ARHGAP26* あるいは *CLDN18-ARHGAP6* 転座が胃癌サブタイプの1つであるゲノム安定型(GS型)に集積し、GS型の14.8%(54例中8例)を占め、*RHOA* 変異と相互排他的であった(12)。Yao らの報告では胃癌100例中3例(3%)に *CLDN18-ARHGAP26* 転座がみられたとしている(47)。なお、胃癌の転座として他のものがまれにあるものの、いずれも少数例で今回本研究で解析対象とした *CLDN18-ARHGAPs* 転座のように高頻度の転座は今まで報告されていない(48-50)。

Claudin-18 はヒト組織の胃と肺で主として発現している密着結合関連蛋白質で、4個の膜貫通(TM)ドメインと PZD ドメイン結合モチーフを有する(51)(図18a)。胃上皮においては Claudin-18 の2つある isoform のうち、isoform2 が発現している(52)。正常胃粘膜において Claudin-18 は上皮同士の密着結合を形成することにより胃粘膜組織の恒常性維持に、細胞内アクチンとクロスリンクする

ことにより細胞形態の維持に関与している(52-57)。腫瘍における解析では、胃癌腫瘍部で CLDN18 は発現が消失していることが多く、CLDN18、3、4 発現消失群はより進んだ病期の症例が多く、予後不良であることが報告されている(58, 59)。培養細胞での検討でも CLDN18 発現低下が細胞増殖と浸潤に関連することが示されており、上記の臨床報告と矛盾しない(60)。

GTP 結合型 Rho 蛋白質を不活性型の GDP 結合型 Rho 蛋白質に変換する Rho GTPase activating protein(RhoGAP)は Rho 蛋白質の内因性 GTPase 活性を 100 倍程度まで高めるとされている(61)。これまでに RhoGAP ドメインを有する蛋白質は 70 個以上が発見されている(62)。胃癌新規転座に関係する ARHGAP26 は BAR、PH、RhoGAP、SH3 ドメインを有しており、胃粘膜を含む種々の臓器で発現している(51)。ARHGAP26 の機能としては BAR ドメインを介した細胞膜の屈曲からはじまるエンドサイトーシスの制御、RhoGAP ドメインを介した Rho 蛋白質の制御などが知られている(61, 63, 64)。これまで胃癌においては、ARHGAP26 の詳細な報告はない。脳転移を伴う肺癌において ARHGAP26 発現が原発巣に対し低下していたとする報告があるが、臨床病理学的因子との相関については不明である(65)。

CLDN18 と ARHGAP26 からなる CLDN18-ARHGAP26 転座蛋白質は図 18a に示したように、CLDN18 由来の膜貫通ドメインと ARHGAP26 の RhoGAP ドメ

イン、SH3 ドメインを有すると考えられる(47)。臨床検体において転座遺伝子の全長を有する mRNA が確認されているので、転座臨床例においても ARHGAP の RhoGAP 活性、SH3 を介した機能は維持されていると推察されるが、ヒト臨床検体での転座陽性症例の臨床病理学的解析報告はない(12, 47)。そこで私は第 2 章で *RHOA* 変異を検索した胃癌 205 例の FFPE ブロック(びまん型胃癌 123 例、腸型胃癌 82 例)から RNA を抽出し、RT-PCR 法で *CLDN18-ARHGAP* 転座の有無を調べ、*CLDN18* に対する FISH で転座の存在を再確認した。*CLDN18-ARHGAP* 転座を有する症例について臨床病理学的因子、予後を解析した。

## 第2節 材料と方法

### 1. 材料：病理組織検体と臨床経過

第1章で用いた胃癌205例を対象とした。手術後再発、生存等の臨床経過はカルテを用いて調べた。病期についてはUICC第7版に基づいて行った(66)。

### 2.方法

#### 2-1. RNA 抽出

FFPEブロックから10 µm厚で未染色標本を10枚作成した。対応するHEスライドと照らし合わせ、できるだけ背景組織が混入しないように腫瘍をメスで手動的に剥離し、1.5ml エッペンドルフチューブに回収した。RNA抽出はRecoverAll Total Nucleic Acid Isolation kit (Ambion、TX、USA)を用い、メーカープロトコルに従って行い、吸光度計 NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific、MA、USA)で濃度を計測、-80°Cで凍結保存した。

#### 2-2. cDNA 合成

逆転写反応はPrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara、Tokyo、Japan)を用いて行い、cDNAを作成した。20µlの反応系にtotal RNA 約1µgを使用した。

### 2-3. PCR

作成した cDNA は *GAPDH* に対するプライマー(PCR 産物 72bp、表 8)を用いて質をチェックし、目的産物の増幅がみられることを確認した。次に、転座特異的プライマー3セット〔*CLDN18-ARHGAP26* exon12 に対し *CLDN18* Fw1 と *ARHGAP26* Rv1(PCR 産物 87bp)、*CLDN18-ARHGAP26* exon10 に対し *CLDN18* Fw1 と *ARHGAP26* Rv2(PCR 産物 146bp)、*CLDN18-ARHGAP6* exon2 に対し *CLDN18* Fw2 と *ARHGAP6* Rv3(PCR 産物 135bp)〕を用いて PCR を実施した(表 8、図 18b)。PCR 10  $\mu$ l の反応系に 0.2 mM dNTP、1X PrimeSTAR GXL Buffer、0.2  $\mu$ l PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (すべて Takara 社)、0.3  $\mu$ M forward primer、0.3  $\mu$ M reverse primer、1  $\mu$ l cDNA を含むように入れた。PCR 条件は 98°C、20 秒プレヒートし、98°C、10 秒→55°C、15 秒→68°C、30 秒を 60 サイクルで行った。PCR 産物はキャピラリー電気泳動装置 MCE-202 MultiNA (SHIMAZU、Kyoto、Japan)を用いて解析した。

表8 転座PCR用プライマー

プライマー	配列
GAPDH Fw	5'-CAACGGATTTGGTCGTATTGG-3'
GAPDH Rv	5'-GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTAA-3'
CLDN18 exon5 Fw1	5'-TTGGGTCCAACACCAAAAAC-3'
ARHGAP26 exon12 Rv1	5'-TCTGGCTGTCCTTGTTCGAG-3'
ARHGAP26 exon10 Rv2	5'-TGCTTCCACATCAAAGCAAA-3'
CLDN18 exon5 Fw2	5'-GCCACAGTGTGCCTACAAG-3'
ARHGAP6 exon2 Rv3	5'-CTGACATGCTGTTCCAGGTG-3'



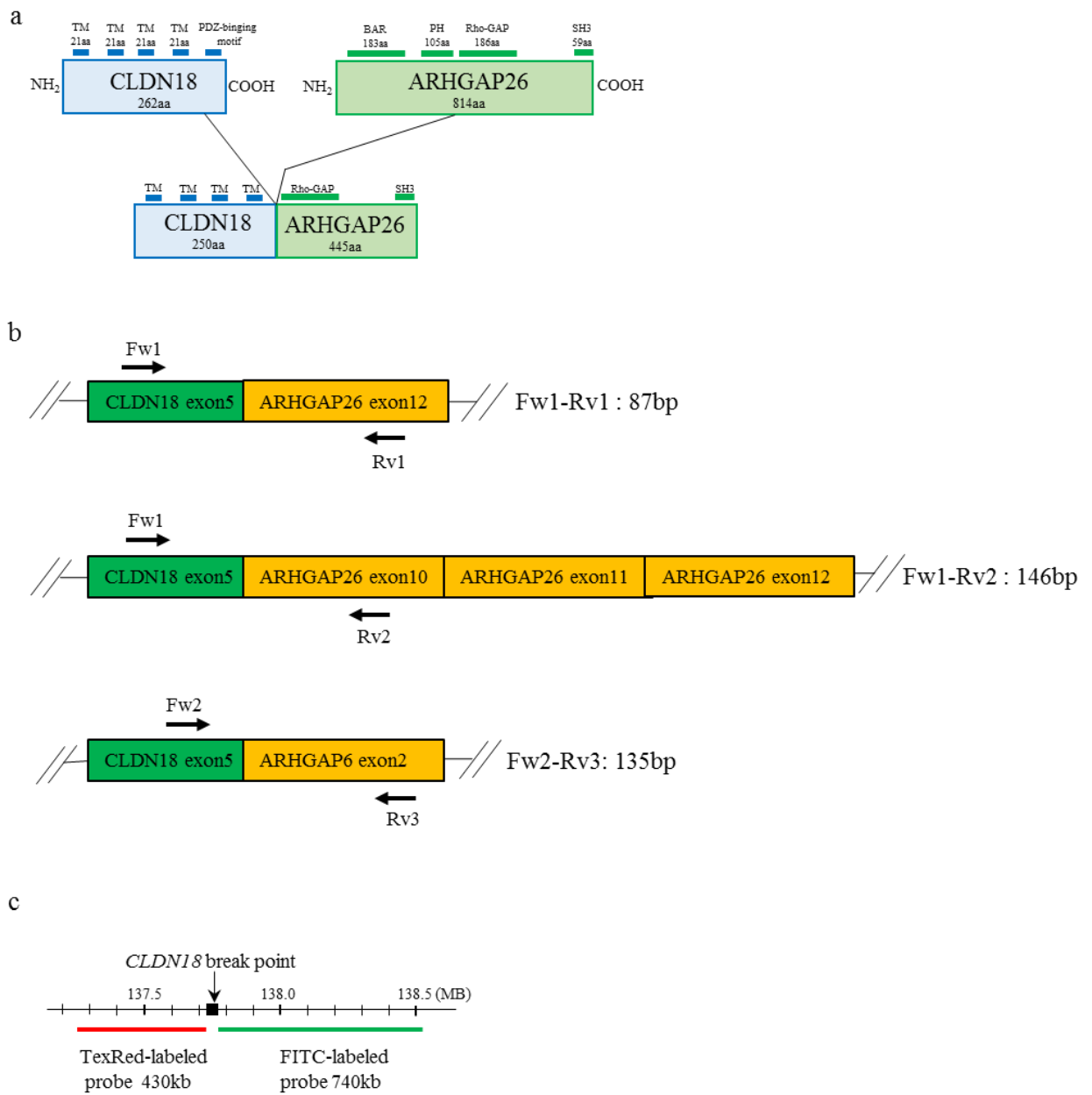


図 18 *CLDN18-ARHGAPs* 転座模式図と FISH プローブ位置

(a) *CLDN18* と *ARHGAP26*、転座蛋白質のドメイン、モチーフを示す。(b) それぞれの転座タイプに対する PCR プライマーの位置を示す。(c) *CLDN18* に対する FISH プローブの位置を示す。

#### 2-4. DNA シーケンシング

転座特異的 PCR でバンドがみられた症例は、PCR 産物をアガロースゲル (2%) で電気泳動し、目的バンド部をゲル切り出しし、MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen、Tokyo、Japan) で精製したのち、シーケンスした。

#### 2-5. Fluorescence *in situ* hybridization

PCR で転座陽性と判断した症例について、*CLDN18* の分離を *in situ* で確認するため、FISH を行った。*CLDN18* split probe (GSP Laboratory、Kawasaki、Japan) を購入し、*RHOA* の FISH と同様の方法で染色し、蛍光顕微鏡で評価した。

FISH probe は *CLDN18* 遺伝子の breakpoint を挟む形で作成され、それぞれ Texas-Red と FITC で標識されたものを使用した(図 18c)。シグナルスプリットの定義は各々のシグナルがシグナル直径の 2 個分以上離れているものとした。

1 症例あたり 100 個以上の核で、スプリットを有する核が 20% 以上の場合、*CLDN18* 転座陽性と判定した。なお *CLDN18* 認識プローブを使用した先行研究がなく、閾値の設定には Vysis ALK Break Apart FISH (Abbott molecular、IL、USA) の基準が 15% であることを参考にし、これよりも高い値である 20% を採用した。また 1 例ではあるが背景粘膜上皮にスプリットシグナルが 100 個細胞をカウントしても認められないことを確認した。また 1 例ではあるが、背景粘膜上皮の細胞を 100 個検討してもスプリットシグナルは認められなかった。

## 2-6. 統計解析

すべての統計解析は JMP Pro 11(SAS Institute Inc., NC, USA)を用いて行った。P 値は 0.05 未満を有意とした。検定は Fisher's exact test あるいは Mann-Whitney U test で行った。全生存期間、無病再発期間については胃癌手術時からの日数とし、前者は全死亡をイベント、後者は腫瘍再発、新規の胃癌発生、全死亡をイベントとして定義し検討した(67)。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて作成し、log-rank 検定を行った。予後因子については単変量解析で有意であった因子のみを用いて、Cox 比例ハザードモデルで多変量解析を行った。なお、病理学的病期は腫瘍深達度、リンパ節転移、遠隔転移因子により規定されるため、多変量解析からは除外した(66)。N 因子、M 因子についても同様に名義ロジスティック解析で多変量解析を行った。

## 2-7. 倫理委員会の承認に関する事項

単一の変異や免疫組織学的解析等を目的とする東京大学医学部附属病院の病理組織検体の使用に関しては、東京大学大学院医学系研究科・医学部研究倫理委員会に申請し、承認を受けた(審査番号 G3521)。

### 第3節 結果

#### 1. RT-PCR、ダイレクトシーケンス結果

胃癌 205 例(びまん型胃癌 123 例、腸型胃癌 82 例)を検討した結果、22 例に転座特異的バンドが確認できた。具体的には *CLDN18-ARHGAP26* exon12 が 20 例、*CLDN18-ARHGAP26* exon10 が 1 例、*CLDN18-ARHGAP6* exon2 が 1 例であった(図 19a)。それぞれのバンドをアガロースゲルから切り出し、精製、ダイレクトシーケンスし、目的のシーケンスであることが確認できた(図 19b)。

#### 2. *CLDN18* FISH 結果

22 例すべての症例で *CLDN18* split probe を使用した FISH を実施し、すべての症例でスプリットシグナルを 20%以上の核に確認できた(図 19c、表 9)。腫瘍内には二倍体のみならず、3 倍体や 4 倍体、異数体が種々の程度に認められた。

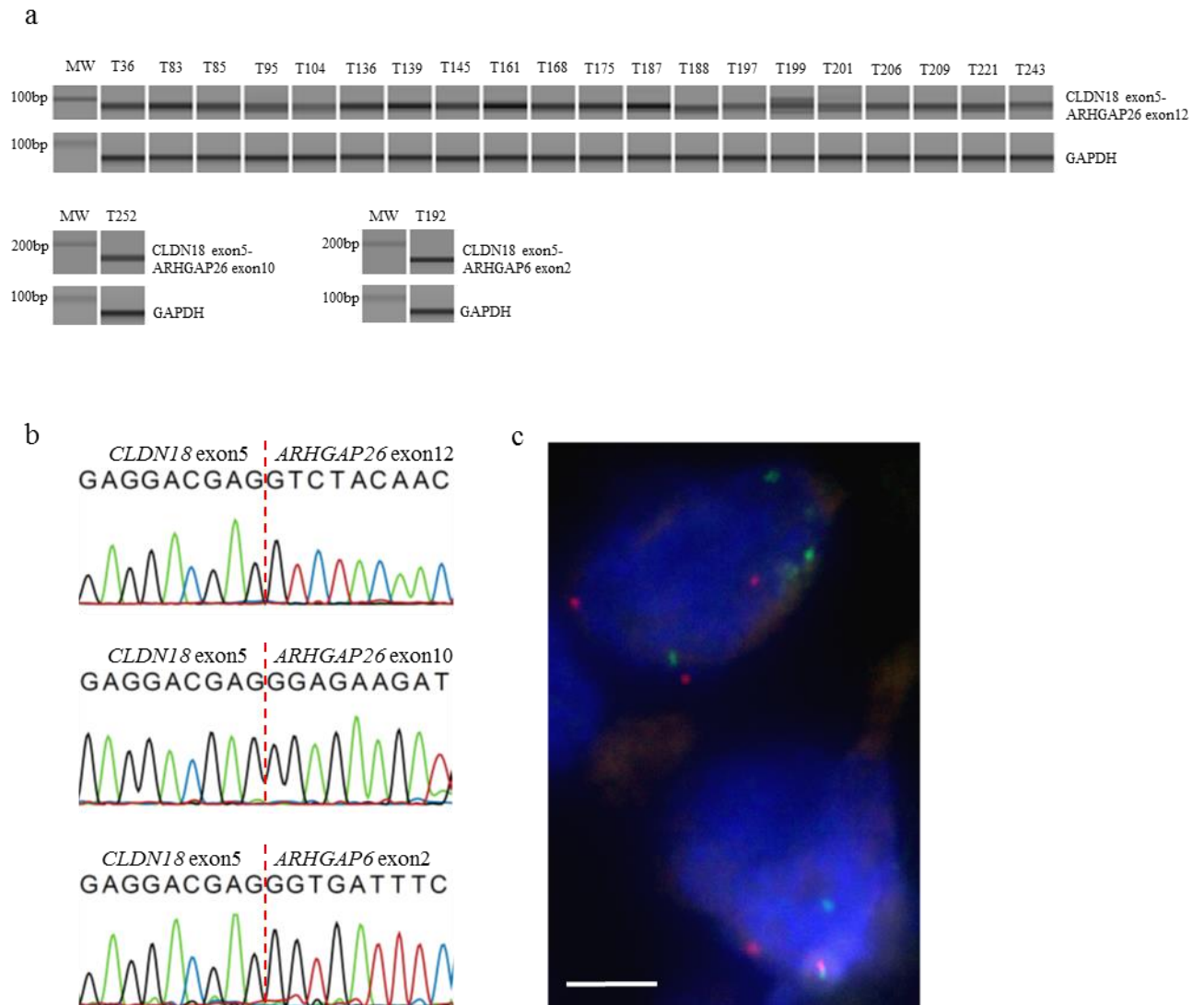


図 19 転座解析結果

(a) 転座特異的 PCR 結果を示す。CLDN18-ARHGAP26exon12 型が 20 例、CLDN18-ARHGAP26exon10 型、CLDN18-ARHGAP6exon2 型がそれぞれ 1 例ずつバンドがみられる。(b) 上段から T83、T252、T192 のダイレクトシーケンス結果を示している。いずれも PCR ターゲットの配列である。(c) CLDN18 FISH 結果。分離した赤と緑のシグナルと分離していないシグナルがみられる。白色バー：5 $\mu$ m

表9 CLDN18 FISH結果

症例番号	スプリット細胞割合(%)
T36	21
T83	29
T85	23
T95	27
T104	23
T136	21
T139	23
T145	23
T161	39
T168	24
T175	34.7
T187	22
T188	28
T192	25
T197	22
T199	31
T201	37
T206	28
T209	23
T221	37
T243	23
T252	34

### 3. 転座と各病理組織学的因子との関係について

胃癌 205 例における転座有無と各臨床病理学的因子の関係について表 10 に示した。びまん型胃癌 123 例中 18 例、腸型胃癌 82 例中 4 例にみられ、びまん型胃癌に有意に多かった( $P=0.037$ )。そこで解析対象をびまん型胃癌に限定し、転座の有無と各病理組織学的因子との相関について解析した(表 11)。その結果、転座を有するびまん型胃癌はより大きく( $P=0.003$ )、リンパ節転移が多く( $pN0-1$  vs  $pN2-3$ ,  $P=0.026$ )、遠隔転移が多かった( $pM0$  vs  $pM1$ ,  $P=0.023$ )。また病理学的病期についても、より進行した症例が多かった(病理学的病期 I + II vs III + IV,  $P=0.023$ )。静脈侵襲と T 因子については、転座症例で多く、深部まで

浸潤する傾向が認められた(静脈侵襲  $P=0.065$ 、T 因子  $P=0.062$ )。次に N 因子、M 因子と転座有無との相関について名義ロジスティック解析で検討したが、有意な相関はみられなかった(表 12、13)。

なお、*RHOA* 変異と転座の関係を検討したところ、*RHOA* 変異(R5Q、R5W、Y42C)と転座は相互排他的で、両者を同時に有する症例はなかった。

表10 胃癌205例における転座と各病理学的因子の相関

因子	胃癌 (n=205)		P 値
	転座陰性 (n = 183)	転座陽性 (n = 22)	
性別			
男性	124	13	0.474
女性	59	9	
平均年齢 (レンジ) (年)	65 (32-90)	61 (33-90)	0.452 <sup>a</sup>
部位			
上部	39	5	0.545
中部	76	8	
下部	68	9	
平均腫瘍サイズ (レンジ) (cm)	5.7 (0.8-22)	7.9 (2.5-20)	0.014 <sup>a</sup>
リンパ管侵襲			
あり	83	10	1.000
なし	100	12	
静脈侵襲			
あり	98	12	1.000
なし	88	10	
Lauren分類			
びまん型	105	18	0.037
腸型	78	4	
T 因子			
T1-2	103	10	0.370
T3-4	80	12	
N 因子			
N0-1	136	13	0.136
N2-3	47	9	
M 因子			
あり	19	5	0.149
なし	164	17	
病理学的病期			
I + II	130	11	0.053
III + IV	53	11	

<sup>a</sup>Mann-Whitney U test



表11 びまん型胃癌123例における転座と各病理学的因子の相関

因子	びまん型胃癌 (n=123)		P 値
	転座陰性 (n = 105)	転座陽性 (n = 18)	
性別			0.798
男性	67	11	
女性	38	7	
平均年齢 (レンジ) (年)	61 (32-87)	60 (33-76)	0.861 <sup>a</sup>
部位			0.545
上部	16	4	
中部	54	7	
下部	35	7	
平均腫瘍サイズ (レンジ) (cm)	5.5 (0.8-20)	8.6 (2.5-20)	0.003 <sup>a</sup>
リンパ管侵襲			0.290
あり	36	9	
なし	69	9	
静脈侵襲			0.065
あり	37	11	
なし	68	7	
T 因子			0.062
T1-2	72	8	
T3-4	33	10	
N 因子			0.026
N0-1	86	10	
N2-3	19	8	
M 因子			0.023
あり	8	5	
なし	97	13	
病理学的病期			0.023
I + II	81	9	
III + IV	24	9	

<sup>a</sup> Mann-Whitney U test

表12 N因子と各病理学的因子に関する単変量・多変量解析結果

因子	N 因子		単変量解析	多変量解析	
	N 0-1	N 2-3	P値	オッズ比(95% C.I.)	P値
性別			0.371	-	-
男性	63	15			
女性	33	12			
年齢(年)			0.392	-	-
< 60	48	11			
≥ 60	47	16			
部位			0.011		
上部・中部	69	12		1.000	
下部	27	15		3.502 (0.859-16.448)	0.081
腫瘍サイズ(cm)			< 0.001		
< 4.7	58	2		1.000	
≥ 4.7	38	25		3.416 (0.368-40.721)	0.276
リンパ管侵襲			< 0.001		
あり	21	24		11.552 (2.056-106.580)	0.004
なし	75	3		1.000	
静脈侵襲			< 0.001		
あり	25	23		0.285 (0.019-2.658)	0.281
なし	71	4		1.000	
転座			0.026		
あり	10	8		4.436 (0.724-41.615)	0.111
なし	86	19		1.000	
T 因子			< 0.001		
T1-2	79	1		1.000	
T3-4	17	26		74.731 (7.409-2182.464)	< 0.001
M 因子			0.0001		
あり	4	9		2.212 (0.425-14.216)	0.353
なし	92	18		1.000	

C.I., confidence interval

表13 M因子と各病理学的因子の単変量・多変量解析結果

Features	M 因子		単変量解析	多変量解析	
	M 0	M 1	P値	オッズ比(95% C.I.)	P値
性別			0.225	-	-
男性	72	6			
女性	38	7			
年齢(年)			1.000	-	-
< 60	54	6			
≥ 60	56	7			
部位			0.364	-	-
上部・中部	74	7			
下部	36	6			
腫瘍サイズ(cm)			0.017		
< 4.7	58	2		1.000	
≥ 4.7	52	11		0.455 (0.051-4.517)	0.478
リンパ管侵襲			0.004		
あり	35	10		1.232 (0.188-8.461)	0.824
なし	75	3		1.000	
静脈侵襲			< 0.0001		
あり	36	12		5.779 (0.558-145.789)	0.151
なし	74	1		1.000	
転座			0.023		
あり	13	5		3.514 (0.742-17.267)	0.112
なし	97	8		1.000	
T 因子			< 0.0001		
T1-2	79	1		1.000	
T3-4	31	12		6.850 (0.550-202.981)	0.142
N 因子			0.0001		
N 0-1	92	4		1.000	
N 2-3	18	9		2.428 (0.464-16.113)	0.301

C.I., confidence interval

#### 4. 生存解析

全生存期間(OS)と無病生存期間(DFS)の平均追跡期間はそれぞれ 2090 日と 2048 日で、術後 5 年の全生存率は 81%、無病生存率は 80%であった。びまん型胃癌を転座の有無で群分けし、全生存期間、無病生存期間を調べた。いずれも Kaplan-Meier 法で生存曲線解析をし、log-rank 検定を行ったところ、転座を有する群で有意に予後が悪かった(OS  $P=0.013$ 、DFS  $P=0.012$ )(図 20)。Cox 比例ハザードモデルを用いた単変量解析では同様の結果であったが、多変量解析では転座有無に関して有意差は認められなかった(表 14)。

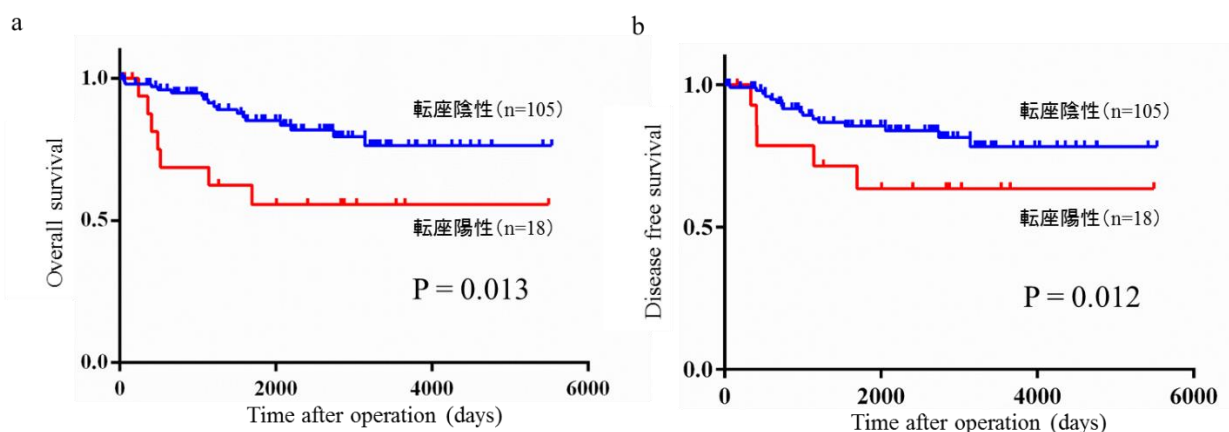


図 20 びまん型胃癌術後生存期間解析

全生存期間(a)、無病生存期間(b)を示す。いずれにおいても転座陽性群で予後不良であった。

表14 全生存期間と無病生存期間の単変量・多変量解析結果

因子	OS			DFS		
	単変量		多変量	単変量		多変量
	ハザード比 (95% C.I.)	P値	ハザード比 (95% C.I.)	P値	ハザード比 (95% C.I.)	P値
性別 男性 (対 女性)	1.259 (0.542-3.259)	0.604	-	-	1.297 (0.559-3.359)	0.556
年齢 (年) ≥ 60 (対 < 60)	2.206 (0.965-5.466)	0.061	-	-	2.164 (0.948-5.363)	0.067
部位 上部・中部 (対 下部)	0.731 (0.327-1.696)	0.454	-	-	0.717 (0.321-1.664)	0.428
腫瘍サイズ (cm) ≥ 4.7 (対 < 4.7)	3.906 (1.627-10.827)	0.002	0.573 (0.166-2.087)	0.390	3.849 (1.604-10.667)	0.002
リンパ管侵襲あり (対 なし)	7.782 (3.231-21.013)	< 0.0001	4.007 (1.282-13.957)	0.016	7.314 (3.037-19.773)	< 0.0001
静脈侵襲あり (対 なし)	9.200 (3.610-28.315)	< 0.0001	0.864 (0.159-4.930)	0.870	8.917 (3.501-27.448)	< 0.0001
転座あり (対 なし)	2.902 (1.122-6.733)	0.030	1.167 (0.370-3.343)	0.782	2.940 (1.135-6.821)	0.028
T 因子 T3-4 (対 T1-2)	14.564 (5.573-45.967)	< 0.0001	4.663 (0.753-30.945)	0.100	13.616 (5.202-43.106)	< 0.0001
N 因子 N2-3 (対 N0-1)	9.596 (4.226-22.586)	< 0.0001	1.896 (0.643-6.351)	0.252	9.269 (4.075-21.858)	< 0.0001
M 因子 あり (対 なし)	16.692 (6.772-39.005)	< 0.0001	5.562 (2.021-15.284)	0.001	16.658 (6.700-39.222)	< 0.0001

C.I., confidence interval

## 第4節 考察

### 1. *CLDN18-ARHGAPs* 転座の頻度、種類について

胃癌の包括的なゲノム解析による *CLDN18-ARHGAP* 転座については TCGA と Yao らの報告のみであり、情報が限られている(12, 47)。TCGA では第2章考察で触れたように胃癌を分子生物学的背景に基づき、4つのサブタイプ(EBV 関連胃癌、マイクロサテライト不安定型、染色体不安定型、ゲノム安定型)に分類し、ゲノム安定型胃癌に *CLDN18-ARHGAPs* 転座、*RHOA* 変異が集積し、相互排他的に認められたことを報告している。転座の頻度としては、TCGA 研究全症例 295 例の 13 例(4.4%)に *CLDN18-ARHGAPs* 転座がみられ、ゲノム安定型 54 例の 15%(8 例)を占めていた(*CLDN18-ARHGAP26* exon12 10 例、*CLDN18-ARHGAP26* exon10 1 例、*CLDN18-ARHGAP6* exon2 2 例)。ゲノム安定型に分類される胃癌は病理組織学的にはびまん型が 72%と多くを占めているため、*RHOA* 変異を含め *CLDN18-ARHGAPs* 転座はびまん型胃癌に特徴的な分子生物学的変化と考えられる。本研究では胃癌 205 例の 10.7% [22 例(*CLDN18-ARHGAP26* exon12 20 例、*CLDN18-ARHGAP26* exon10 1 例、*CLDN18-ARHGAP6* exon2 1 例)]、びまん型胃癌 123 例の 14.6% [18 例(*CLDN18-ARHGAP26* exon12 16 例、*CLDN18-ARHGAP26* exon10 1 例、*CLDN18-ARHGAP6* exon2 1 例)] に転座がみられ、その頻度、転座の種類、Lauren 分類における分布は TCGA のデー

タとほぼ一致する結果であった。一方、Yao らの報告では胃癌 100 例を WGS、RNA-seq で調べたところ 3 例のみに *CLDN18-ARHGAP26* 転座が見られたとしており、本研究と TCGA のデータとは大きく異なっていた(12, 47)。原因の一つとして Yao らの解析した胃癌 100 例のうち転座が多くみられると想定されるびまん型は 30 例しか含まれておらず、このために低い頻度を示したと考えられる。他、人種、環境因子、母集団の特徴による影響の可能性があり、今後さらに大きな集団を対象に検討する必要がある。

## 2. 転座と臨床病理学的因子との相関について

転座を有するびまん型胃癌群で、より腫瘍サイズが大きく、リンパ節転移、遠隔転移が多いという特徴が明らかになった(表 11、12、13)。また全生存期間、無病生存期間についても転座が予後不良因子である可能性が示され(図 20、表 14)、転座蛋白質がびまん型胃癌腫瘍細胞の浸潤や転移・播種に重要な意義を有することが判明した。*CLDN18-ARHGAP26* 転座胃癌の特徴は本研究によっではじめて明らかにされたもので、今後症例の蓄積による検討が必要である。

転座と *RHOA* 変異(R5Q、R5W、Y42C)は本研究において相互排他的であった。*RHOA* 変異の包括的な検討を行っている TCGA のデータにおいても *RHOA*

変異と転座は相互排他的で、本研究と同様の結果であった(12)。

なおプレリミナリーなデータであるが、第2章の腫瘍内均一性検討と同様に転座を有する症例の数例については腫瘍中心部、辺縁部、リンパ節転移巣にRT-PCR法あるいはFISH法を用いて転座の有無を検討しており、その結果すべての部位に転座が検出されている。この結果から転座蛋白質は変異型RHOA蛋白質と同様に浸潤、転移形成に重要と考えられた。

### 3. 転座蛋白質機能について

びまん型胃癌で反復してみられる転座で現在報告されているのは *CLDN18-ARHGAP* 転座のみで、いずれも細胞接着蛋白質である *CLDN18* と *RHOA* を不活性型に維持する *ARHGAP* の組合せで、融合蛋白質では RhoGAP ドメインが保存されていることは非常に興味深い(12, 47)。図 18a に示したように、*CLDN18* は 4 回膜貫通蛋白質で、転座形成時に失われる C 末側に PDZ 結合モチーフを有している。一方 *ARHGAP* は転座で失われる N 末側に BAR、PH ドメインがあり、転座形成後も inframe で維持される C 末側に RhoGAP、SH3 ドメインを有している(12)。従って転座蛋白質は N 末側に膜貫通ドメインを有し、C 末側に RhoGAP ドメイン、SH3 ドメインを有すると推察され、細胞内局在は膜上と膜直下になると考えられる。実際、臨床検体を使用した蛍光二重染色で転座蛋白質が細胞膜部分に存在すること示唆するデータが報告されている



(47)。通常、ARHGAP は 90%以上が細胞質に存在するとされ、残りの一部が膜直下で活性化状態にある RHOA と反応し RHOA を不活性型に変換し、RHOA

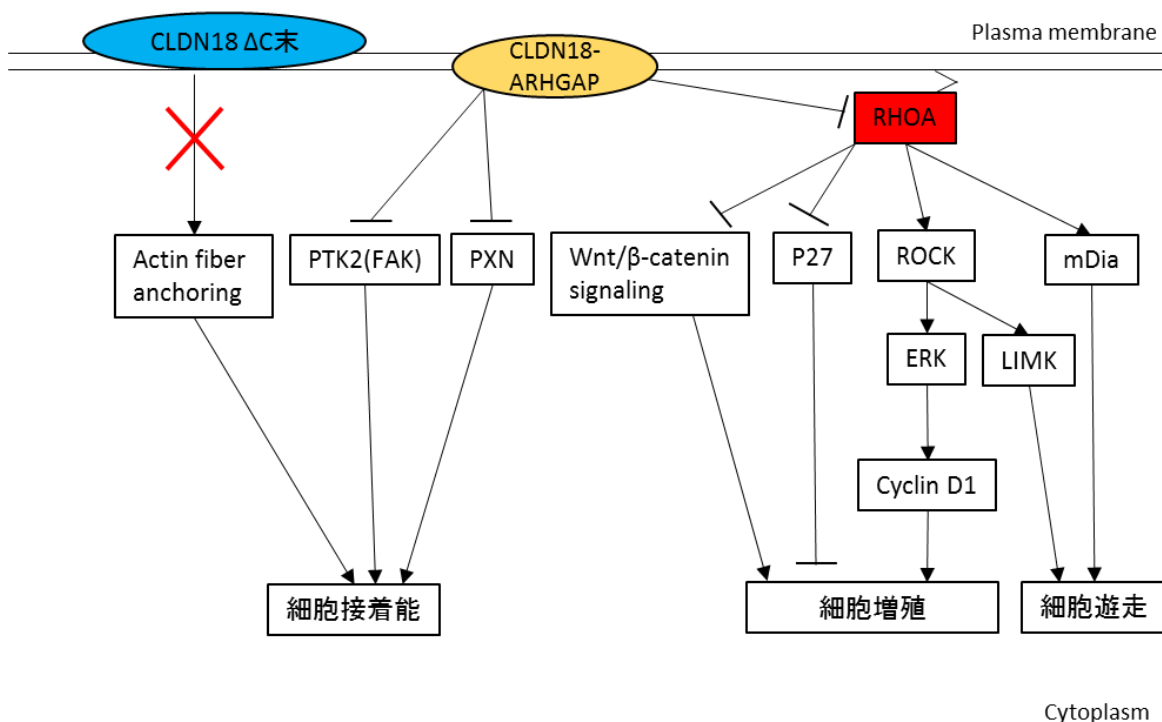


図 21 CLDN18-ARHGAP 転座と RHOA-pathway の関連

CLDN18-ARHGAP 転座、RHOA、CLDN18(C 末欠失)の細胞接着、増殖、遊走に影響すると考えられる分子についてその関連を示している。CLDN18C 末欠損蛋白質は細胞質アクチンとの接続部を消失し、細胞接着能の低下を引き起こす。転座蛋白質も細胞接着蛋白質の PTK2、PXN を介して接着能の低下を誘導する。RHOA は ROCK/cyclin D1 を介して細胞増殖を誘導するが、一方で Wnt/β-catenin 経路を介して細胞増殖を抑制しているとする報告もある。細胞遊走に関しては、LIMK、mDia 等を介して actin fiber 構築を制御し、遊走に寄与している。

シグナルを制御している(61, 64) (図 21)。このため、転座を起こした ARHGAP

は、二倍体で一方のアレルが正常と仮定すると一腫瘍細胞内で翻訳される

ARHGAP 蛋白質の半数が CLDN18 との融合蛋白質となり、RhoGAP ドメイン

を有する蛋白質が正常細胞と比較し多く細胞膜直下に係留されると考えられ

る。これにより転座症例では RHOA が不活化され、RHOA-pathway に関して RHOA 変異例と同様の変化がおこり、細胞遊走、浸潤、接着機能等の変化が誘導されていると考えられる。*In vitro* 実験系では転座蛋白質を強制発現させると、有意に細胞接着能・凝集能が低下し、浸潤能が上昇することが示されている(47)。またこれらの事実は転座臨床例でみられた特徴(T、N、M 因子、大きさ)とも一致する。RHOA 変異と転座が相互排他的であったことから RHOA-pathway 異常はびまん型胃癌形成に重要な意義を有していると考えられる。腫瘍細胞増殖という点に関しては、RHOA-pathway は亢進・抑制の両方に関与することが報告されており、胃癌における役割についてはさらに検討する必要がある(68)。

転座蛋白質は RHOA-pathway 以外にも影響を及ぼしている可能性があり、これには SH3 ドメインを介するものと CLDN18 の PDZ 結合モチーフの消失によるものが考えられる(図 21)。ARHGAP26 の SH3 ドメインは細胞接着関連蛋白質の PTK2(FAK)、PXN と結合し、細胞遊走・浸潤を制御しており、転座蛋白質を強制発現させた細胞では、細胞接着関連蛋白質の ILK、TLN1、PXN の発現の低下、インテグリンファミリーの発現低下がみられ、転座蛋白質の SH3 も転座症例での個細胞性腫瘍細胞浸潤に寄与していると推察される(47, 69, 70)。また CLDN18 の PDZ 結合モチーフは密着結合を形成する TJ 蛋白質(TJP1、

TJP2、TJP3)との結合に必要で、このモチーフの欠損により細胞接着能減少に関与していると考えられる(71, 72)。

予後の悪いびまん型胃癌に対して有効な治療法が少ない現状において、*CDLN18-ARHGAP* 転座はびまん型胃癌の重要な創薬ターゲットである。いくつかの複数のドメインを有し、正常細胞には存在しない蛋白質であるということからも有効なインヒビターの開発が期待される。本研究で明らかになった転座を有するびまん型胃癌の特徴は予後不良であり、特徴的なサブグループとして、治療、経過観察を行うべきである。

## 第4章 結語

本研究において、私は *RHOA* 変異が早期癌を含めびまん型胃癌に特異的な変異であることを再確認し、*Y42C* 変異例が *R5Q* 変異例、*R5W* 変異例と比較し、浸潤傾向が強いことを明らかにした。さらに *RHOA* 変異癌では変異アレル頻度の不均一性や組織学的な不均一性が認められるが、粘膜内、浸潤部、リンパ節転移部のすべてに同一の *RHOA* 変異がみられた。さらに深部浸潤部、リンパ節転移部において変異アレル頻度の上昇がみられることを明らかにした。これらの結果から *RHOA* 変異が腫瘍発生早期から存在し、腫瘍発生・進展・転移にも *RHOA* 変異が重要な役割を担っていると考えられた。

胃癌における *CLDN18-ARHGAPs* 転座の解析では、びまん型胃癌の 14.6% に転座を認め、*RHOA* 変異と相互排他的であることを示した。臨床病理学的な特徴としては、転座陽性例は陰性例に対し、有意に大きく、リンパ節転移、遠隔転移が多かった。さらに全生存期間、無病生存期間も転座陽性例で短い傾向にあることが判明し、転座蛋白質が腫瘍の浸潤、進展、転移に重要な意義を有することを本研究で示すことができた。

現在、胃癌に対しては *HER2* を対象とした分子標的薬治療が行われているが、びまん型胃癌では対象とならない症例がほとんどである。Targetable と予想される *RHOA* 変異蛋白質と *CLDN18-ARHGAP* 転座蛋白質は今後の胃癌治療

法開発においてキーとなる蛋白質で、その変異症例の臨床病理学的特徴を明らかにした意義は大きい。*RHOA* 変異に関しては深部浸潤部、転移において、変異アレルの上昇が認められたため、変異型 *RHOA* 蛋白質の分解促進等を引き起こす薬剤を開発できれば効果が期待できる可能性がある。またびまん型胃癌に特徴的にみられた *RHOA* 変異と *CLDN18-ARHGAP* 転座がいずれも *RHOA*-*pathway* を制御する蛋白質で、両者が相互排他的にみられたことから、*RHOA*-*pathway* 異常がびまん型胃癌の成り立ちに大きな影響を有していることを示しており、この経路の制御に注目した研究が今後必要である。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご高配とご指導を賜りました、東京大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学分野、深山正久教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、東京医科歯科大学難治疾患研究所ゲノム病理学、石川俊平教授、東京大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学分野、牛久哲男准教授、阿部浩幸助教、林玲匡助教、宮川隆特任助教、国田朱子助教のご指導、ご助言に深く御礼申し上げます。

本研究の資料作製、実験操作のご協力いただきました、東京大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学分野、佐久間慶技術専門職員、山村はるみ技術補佐員、西本あい子技術補佐員、竹下貴三子技術補佐員に深く感謝いたします。

本研究との統合解析にご協力頂きました、先行研究の筆頭著者である東京大学先端科学技術研究所ゲノムサイエンス分野、垣内美和子氏に深く感謝いたします。

東京大学胃食道外科、瀬戸泰之教授には患者データをご提供して頂きました。深く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、上記以外のさまざまな方にご指導、ご鞭撻を頂きました。深く御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr> (last accessed on 19 January 2016).
2. Center for Cancer Control and Information Services, National Cancer Center, Japan. Available from: [http://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/index.html](http://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/index.html) (last accessed on 19 January 2016).
3. Lauren P. The two histopathological main types of gastric carcinoma : Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histoclinical classification. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*;64:31-49, 1965.
4. Hayashi T, Yoshikawa T, Bonam K, Sue-Ling HM, Taguri M, Morita S, et al. The superiority of the seventh edition of the TNM classification depends on the overall survival of the patient cohort: comparative analysis of the sixth and seventh TNM editions in patients with



gastric cancer from Japan and the United Kingdom.

Cancer;119(7):1330-7, 2013.

5. Henson DE, Dittus C, Younes M, Nguyen H, Albores-Saavedra J.  
Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: increase in the signet ring cell type. Archives of pathology & laboratory medicine;128(7):765-70, 2004.
6. Kaneko S, Yoshimura T. Time trend analysis of gastric cancer incidence in Japan by histological types, 1975-1989. Br J Cancer;84(3):400-5, 2001.
7. Endo K, Sakurai M, Kusumoto E, Uehara H, Yamaguchi S, Tsutsumi N, et al. Biological significance of localized Type IV scirrhous gastric cancer. Oncol Lett;3(1):94-9, 2012.
8. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. Lancet (London, England);376(9742):687-

- 97, 2010.
9. Tanner M, Hollmen M, Junttila TT, Kapanen AI, Tammola S, Soini Y, et al. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol*;16(2):273-8, 2005.
  10. Wang K, Yuen ST, Xu J, Lee SP, Yan HH, Shi ST, et al. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat Genet*;46(6):573-82, 2014.
  11. Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, Tanaka A, Hayashi A, et al. Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat Genet*;46(6):583-7, 2014.
  12. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*;513(7517):202-9, 2014.
  13. Zang ZJ, Cutcutache I, Poon SL, Zhang SL, McPherson JR, Tao J, et al. Exome sequencing of gastric adenocarcinoma identifies recurrent somatic mutations in cell adhesion and chromatin remodeling genes.

- Nat Genet;44(5):570-4, 2012.
14. Wang K, Kan J, Yuen ST, Shi ST, Chu KM, Law S, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer. Nat Genet;43(12):1219-23, 2011.
  15. Ushiku T, Ishikawa S, Kakiuchi M, Tanaka A, Katoh H, Aburatani H, et al. RHOA mutation in diffuse-type gastric cancer: a comparative clinicopathology analysis of 87 cases. Gastric Cancer, 2015.
  16. Olson MF, Paterson HF, Marshall CJ. Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. Nature;394(6690):295-9, 1998.
  17. Mitchison TJ, Cramer LP. Actin-based cell motility and cell locomotion. Cell;84(3):371-9, 1996.
  18. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. Cell;84(3):359-69, 1996.
  19. Rohde M, Richter J, Schlesner M, Betts MJ, Claviez A, Bonn BR, et al. Recurrent RHOA mutations in pediatric Burkitt lymphoma treated according to the NHL-BFM protocols. Genes Chromosomes Cancer;53(11):911-6, 2014.

20. Yoo HY, Sung MK, Lee SH, Kim S, Lee H, Park S, et al. A recurrent inactivating mutation in RHOA GTPase in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet*;46(4):371-5, 2014.
21. Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Shiraishi Y, Ishii R, Miyake Y, et al. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet*;46(2):171-5, 2014.
22. Palomero T, Couronne L, Khiabani H, Kim MY, Ambesi-Impiombato A, Perez-Garcia A, et al. Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat Genet*;46(2):166-70, 2014.
23. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*;7(4):248-9, 2010.
24. Dvorsky R, Blumenstein L, Vetter IR, Ahmadian MR. Structural insights into the interaction of ROCK1 with the switch regions of RhoA. *J Biol Chem*;279(8):7098-104, 2004.
25. Maesaki R, Ihara K, Shimizu T, Kuroda S, Kaibuchi K, Hakoshima T. The structural basis of Rho effector recognition revealed by the crystal

- structure of human RhoA complexed with the effector domain of PKN/PRK1. *Molecular cell*;4(5):793-803, 1999.
26. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer*;14(2):101-12, 2011.
27. Wyckoff JB, Pinner SE, Gschmeissner S, Condeelis JS, Sahai E. ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. *Curr Biol*;16(15):1515-23, 2006.
28. Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol*;160(2):267-77, 2003.
29. Sahai E, Marshall CJ. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol*;5(8):711-9, 2003.
30. Qin J, Jones RC, Ramakrishnan R. Studying copy number variations using a nanofluidic platform. *Nucleic Acids Res*;36(18):e116, 2008.
31. Dube S, Qin J, Ramakrishnan R. Mathematical analysis of copy

- number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device. *PLoS One*;3(8):e2876, 2008.
32. Shinde V, Burke KE, Chakravarty A, Fleming M, McDonald AA, Berger A, et al. Applications of pathology-assisted image analysis of immunohistochemistry-based biomarkers in oncology. *Vet Pathol*;51(1):292-303, 2014.
33. Braun M, Kirsten R, Rupp NJ, Moch H, Fend F, Wernert N, et al. Quantification of protein expression in cells and cellular subcompartments on immunohistochemical sections using a computer supported image analysis system. *Histology and histopathology*;28(5):605-10, 2013.
34. Rojo MG, Bueno G, Slodkowska J. Review of imaging solutions for integrated quantitative immunohistochemistry in the Pathology daily practice. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*;47(3):349-54, 2009.
35. Versluis M, de Lange MJ, van Pelt SI, Ruivenkamp CA, Kroes WG, Cao J, et al. Digital PCR validates 8q dosage as prognostic tool in

- uveal melanoma. *PLoS One*;10(3):e0116371, 2015.
36. Miotke L, Lau BT, Rumma RT, Ji HP. High sensitivity detection and quantitation of DNA copy number and single nucleotide variants with single color droplet digital PCR. *Anal Chem*;86(5):2618-24, 2014.
  37. Miura Y, Keira Y, Ogino J, Nakanishi K, Noguchi H, Inoue T, et al. Detection of specific genetic abnormalities by fluorescence in situ hybridization in soft tissue tumors. *Pathol Int*;62(1):16-27, 2012.
  38. Huvneers S, Danen EH. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *Journal of cell science*;122(Pt 8):1059-69, 2009.
  39. Linder S, Aepfelbacher M. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends in cell biology*;13(7):376-85, 2003.
  40. Chellaiah MA, Soga N, Swanson S, McAllister S, Alvarez U, Wang D, et al. Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption. *J Biol Chem*;275(16):11993-2002, 2000.
  41. Chodniewicz D, Klemke RL. Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a CAS/Crk scaffold. *Biochimica et biophysica acta*;1692(2-3):63-76, 2004.
  42. Ren XD, Kiosses WB, Sieg DJ, Otey CA, Schlaepfer DD, Schwartz MA.

- Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover. *Journal of cell science*;113 ( Pt 20):3673-8, 2000.
43. Arthur WT, Petch LA, Burridge K. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr Biol*;10(12):719-22, 2000.
44. Chen K, Yang D, Li X, Sun B, Song F, Cao W, et al. Mutational landscape of gastric adenocarcinoma in Chinese: implications for prognosis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*;112(4):1107-12, 2015.
45. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*;366(10):883-92, 2012.
46. Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*;472(7341):90-4, 2011.
47. Yao F, Kausalya JP, Sia YY, Teo AS, Lee WH, Ong AG, et al. Recurrent Fusion Genes in Gastric Cancer: CLDN18-ARHGAP26 Induces Loss of Epithelial Integrity. *Cell Rep*;12(2):272-85, 2015.



48. Xu X, Xu L, Gao F, Wang J, Ye J, Zhou M, et al. Identification of a novel gene fusion (BMX-ARHGAP) in gastric cardia adenocarcinoma. *Diagnostic pathology*;9:218, 2014.
49. Lee YS, Cho YS, Lee GK, Lee S, Kim YW, Jho S, et al. Genomic profile analysis of diffuse-type gastric cancers. *Genome biology*;15(4):R55, 2014.
50. Lee J, Lee SE, Kang SY, Do IG, Lee S, Ha SY, et al. Identification of ROS1 rearrangement in gastric adenocarcinoma. *Cancer*;119(9):1627-35, 2013.
51. Uhlen M, Bjorling E, Agaton C, Szigyarto CA, Amini B, Andersen E, et al. A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Molecular & cellular proteomics* : *MCP*;4(12):1920-32, 2005.
52. Niimi T, Nagashima K, Ward JM, Minoo P, Zimonjic DB, Popescu NC, et al. claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing. *Mol Cell Biol*;21(21):7380-90, 2001.

53. Tamura A, Yamazaki Y, Hayashi D, Suzuki K, Sentani K, Yasui W, et al. Claudin-based paracellular proton barrier in the stomach. *Ann N Y Acad Sci*;1258:108-14, 2012.
54. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*;2(4):285-93, 2001.
55. Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem*;275(27):20520-6, 2000.
56. Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*;273(45):29745-53, 1998.
57. Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol*;138(1):181-92, 1997.
58. Matsuda Y, Semba S, Ueda J, Fuku T, Hasuo T, Chiba H, et al. Gastric and intestinal claudin expression at the invasive front of gastric

- carcinoma. *Cancer Sci*;98(7):1014-9, 2007.
59. Sanada Y, Oue N, Mitani Y, Yoshida K, Nakayama H, Yasui W. Down-regulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in gastric cancer with an intestinal phenotype. *J Pathol*;208(5):633-42, 2006.
60. Oshima T, Shan J, Okugawa T, Chen X, Hori K, Tomita T, et al. Down-regulation of claudin-18 is associated with the proliferative and invasive potential of gastric cancer at the invasive front. *PLoS One*;8(9):e74757, 2013.
61. Rittinger K, Walker PA, Eccleston JF, Smerdon SJ, Gamblin SJ. Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature*;389(6652):758-62, 1997.
62. Tcherkezian J, Lamarche-Vane N. Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*;99(2):67-86, 2007.
63. Lundmark R, Doherty GJ, Howes MT, Cortese K, Vallis Y, Parton RG, et al. The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the

- CLIC/GEEC endocytic pathway. *Curr Biol*;18(22):1802-8, 2008.
64. Rittinger K, Walker PA, Eccleston JF, Nurmahomed K, Owen D, Laue E, et al. Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature*;388(6643):693-7, 1997.
65. Zohrabian VM, Nandu H, Gulati N, Khitrov G, Zhao C, Mohan A, et al. Gene expression profiling of metastatic brain cancer. *Oncology reports*;18(2):321-8, 2007.
66. AJCC cancer staging handbook : from the AJCC cancer staging manual. 7th ed ed: Springer; 2010. xix, 718 p. p.
67. Han MA, Oh MG, Choi IJ, Park SR, Ryu KW, Nam BH, et al. Association of family history with cancer recurrence and survival in patients with gastric cancer. *J Clin Oncol*;30(7):701-8, 2012.
68. Rodrigues P, Macaya I, Bazzocco S, Mazzolini R, Andretta E, Dopeso H, et al. RHOA inactivation enhances Wnt signalling and promotes colorectal cancer. *Nat Commun*;5:5458, 2014.
69. Doherty GJ, Lundmark R. GRAF1-dependent endocytosis. *Biochem Soc Trans*;37(Pt 5):1061-5, 2009.
70. Taylor JM, Macklem MM, Parsons JT. Cytoskeletal changes induced

by GRAF, the GTPase regulator associated with focal adhesion kinase, are mediated by Rho. *Journal of cell science*;112 ( Pt 2):231-42, 1999.

71. Cordenonsi M, D'Atri F, Hammar E, Parry DA, Kendrick-Jones J, Shore D, et al. Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol*;147(7):1569-82, 1999.
72. Citi S, Sabanay H, Jakes R, Geiger B, Kendrick-Jones J. Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature*;333(6170):272-6, 1988.